

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Sofija V. Beloica

**MEHANISTIČKO MODELOVANJE I  
MOGUĆNOST PREDVIĐANJA BRZINE  
RASTVARANJA LEKOVITE SUPSTANCE IZ  
TABLETA *IN VITRO* I *IN VIVO***

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Sofija V. Beloica

**MECHANISTIC MODELING AND  
PREDICTABILITY OF *IN VITRO* AND  
*IN VIVO* DRUG DISSOLUTION FROM  
TABLETS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

**Mentor**

---

Prof. dr Jelena Parojčić  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

**Članovi komisije**

---

Prof. dr Svetlana Ibrić  
Univezitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Sandra Cvijić  
Univezitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

Doc. dr Biljana Gatarić  
Univerzitet u Banja Luci-Medicinski fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_

Želela bih da izrazim zahvalnost svom mentoru prof. dr Jeleni Parojčić na izboru teme disertacije, posvećenom vremenu, ukazanom poverenju i pomoći koju mi je pružila u toku rada na ovoj doktorskoj disertaciji.

Članovima komisije prof. dr Svetlani Ibrić, prof. dr Sandri Cvijić i doc. dr Biljani Gatarić zahvaljujem na podršci, korisnim savetima i saradnji prilikom izrade ove disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojim roditeljima Mirjani i Vukašinu i sestrama Brankici i Emiliji koji su uvek bili moja podrška i oslonac i koji mi pružaju безусловnu ljubav i razumevanje.

Posebnu i najveću zahvalnost dugujem suprugu Ivanu i mojim anđelima Mili i Lazaru na beskrajnom strpljenju, razumevanju i ljubavi koju mi pružaju i koji daju smisao svemu što radim i čemu težim u životu.

# MEHANISTIČKO MODELOVANJE I MOGUĆNOST PREDVIĐANJA BRZINE RASTVARANJA LEKOVITE SUPSTANCE IZ TABLETA *IN VITRO* I *IN VIVO*

## Sažetak

Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata prepoznato je kao najznačajnija *in vitro* metoda u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova. Adekvatno osmišljenim *in vitro* testom moguće je simulirati ponašanje lekovite supstance *in vivo*, te na taj način uočiti eventualne probleme vezane za njenu biološku raspoloživost. Dobijeni profili mogu se koristiti kao ulazni parametri za *in silico* simulacije, a ovakav integrisani pristup ima za cilj da ubrza razvoj efikasnih i bezbednih lekova u skladu sa potrebama i očekivanjima pacijenata. Osnovni cilj ovog rada je procena mogućnosti primene mehanističkog *in vitro-in vivo-in silico* modelovanja u razvoju *in vitro* metode za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata koja omogućava predviđanje *in vivo* ponašanja leka i identifikaciju klinički značajnih specifikacija za lekovite supstance koje pokazuju različite biofarmaceutske karakteristike i pripadaju različitim klasama Biofarmaceutskog sistema klasifikacije.

U istraživanju je ispitivan uticaj fiziološki zasnovanih medijuma i dinamičkih uređaja na brzinu rastvaranja lekovitih supstanci iz ispitivanih preparata. Kod najvećeg broja ispitivanih preparata nije zabeležen značajan uticaj fizioloških surfaktanata na brzinu rastvaranja. Takođe, u slučaju preparata sa trenutnim oslobađanjem, primena dinamičkih uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja nije pokazala prednost u odnosu na aparaturu sa lopaticom. Dobijeni rezultati ukazuju da se za najveći broj ispitivanih preparata ispitivanje brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje medijuma koji simulira sadržaj tankog creva na gladno bez dodatka fizioloških surfaktanata može usvojiti kao bioprediktivna metoda za ispitivanje brzine rastvaranja. Ovakav zaključak podržan je i visokim stepenom *in vitro-in vivo* korelacije između ispitivanih profila.

Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje uz primenu Simcyp® i GastroPlus™ programskih paketa omogućilo je uspešno predviđanje apsorpcije ispitivanih model supstanci na osnovu odgovarajućeg seta ulaznih podataka. Ipak, u najvećem broju slučajeva, bilo je neophodno primeniti optimizaciju parametara kako bi se postiglo slaganje simuliranog i *in vivo* profila koncentracije lekovite supstance u plazmi (tzv. „*middle out*“ pristup). Analiza osetljivosti parametara pokazala se vrlo korisnom alatkom koja može ukazati na kritične parametre koji značajno utiču na obim i brzinu apsorpcije. Na primeru model supstance ibuprofena dokazana je i generalizaciona sposobnost razvijenog modela za predviđanje apsorpcije lekovite supstance iz različitih farmaceutskih oblika. Iako su prisutne izvesne razlike, pre svega u pogledu obima apsorpcije, profili dobijeni Simcyp® i GastroPlus™ simulacijama su, generalno, bili međusobno slični. Pokazano je da se gastrointestinalna simulacija može koristiti kao metoda izbora za predviđanje apsorpcije lekovitih supstanci, kao i za mehanističko proučavanje procesa apsorpcije u slučajevima kada primena konvencionalnih farmakokinetičkih metoda nije moguća (lekovite supstance klase 2 i 4 BCS koje se zbog niske rastvorljivosti ne mogu primeniti u obliku rastvora za intravensku primenu i/ili u slučajevima kada lekovita supstanca pokazuje nelinearnu kinetiku usled izraženog presistenskog metabolizma, uticaja transportera i td.). Rezultati dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije bili su, generalno, u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom konvencionalne farmakokinetičke analize.

**Ključne reči:** biofarmaceutska karakterizacija, bioprediktivna metoda ispitivanja brzine rastvaranja, klinički značajne specifikacije, fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje, *in vitro-in vivo* korelacija, biowaiver

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

# MECHANISTIC MODELING AND PREDICTABILITY OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* DRUG DISSOLUTION FROM TABLETS

## Summary

Dissolution test for solid oral dosage forms has been recognized as the most important *in vitro* method in biopharmaceutical drug characterization. With the right choice of experimental conditions, it is possible to simulate the *in vivo* drug behavior, and in that way to identify possible problems related to its bioavailability. Experimentally obtained *in vitro* drug dissolution profiles can be used as input parameters for *in silico* simulations, and this integrated approach aims to accelerate development of effective and safe drugs in accordance with patients needs and expectations. The main objective of this work was to assess the possibility of applying mechanistic *in vitro-in vivo-in silico* modeling in the development of an *in vitro* drug dissolution method, that enables prediction of *in vivo* behavior of the drug and identification of clinically significant specifications for drug substances that show different biopharmaceutical properties and belong to different classes of the Biopharmaceutical Classification System.

In this research we examined the influence of physiologically based dissolution media and dynamic dissolution devices on the dissolution rate of drug substances from selected preparations. No significant influence of physiological surfactants on the dissolution rate was recorded for the majority of tested preparations. Also, in the case of immediate release preparations, the dynamic dissolution devices did not show an advantage over the compendial paddle apparatus. The obtained results indicate that, for the majority of tested preparations, paddle apparatus using fasted state simulated intestinal fluid without addition of physiological surfactants can be adopted as biopredictive dissolution method. This conclusion is also supported by the high level of *in vitro-in vivo* correlation between the examined profiles.

Physiologically based biopharmaceutics modeling using Simcyp<sup>®</sup> and GastroPlus<sup>™</sup> software packages enabled to successfully predict absorption of selected drugs based on the appropriate set of input data. However, in the majority of cases, it was necessary to apply parameter optimization in order to achieve agreement between the simulated and the *in vivo* drug substance plasma profile (the so-called „middle out“ approach). Parameter sensitivity analysis proved to be a very useful tool that can indicate critical parameters that significantly affect the extent and rate of absorption. Using the example of model substance ibuprofen, the generalization ability of the developed model for predicting drug absorption from different dosage forms was proven. Although there are some differences, primarily regarding the extent of absorption, the profiles obtained by Simcyp<sup>®</sup> and GastroPlus<sup>™</sup> simulations were, in general, similar to each other. It has been shown that gastrointestinal simulations can be used as method of choice for predicting drug absorption, as well as for mechanistic study of drug absorption process in cases where application of conventional pharmacokinetic methods is not possible (drug substances of BCS class 2 and 4 which due to low solubility cannot be administered in the form of intravenous solution and/or in cases when drug substance shows non-linear kinetics due to pronounced pre-systemic metabolism, influence of transporters, etc.). The results obtained using gastrointestinal simulation were, in general, in agreement with the results obtained using conventional pharmacokinetic analysis.

**Key words:** biopharmaceutical characterization, *in vivo* predictive dissolution methodology, clinically relevant dissolution specification, physiologically based biopharmaceutics modeling, *in vitro-in vivo* correlation, biowaiver

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical technology

# Sadržaj

OPŠTI DEO .....	13
<b>1. MOGUĆNOST PREDVIĐANJA <i>IN VIVO</i> PONAŠANJA LEKA NA OSNOVU REZULTATA <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJA BRZINE RASTVARANJA LEKOVITE SUPSTANCE IZ PREPARATA .....</b>	<b>14</b>
1.1 Osnovni pojmovi i značaj.....	14
1.2 Razvoj bioprediktivne i diskriminativne metode za <i>in vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata .....	17
1.3 Uspostavljanje klinički relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata .....	26
<b>2. INTEGRISANI BIOFARMACEUTSKI PRISTUP U RAZVOJU I KARAKTERIZACIJI LEKOVA .....</b>	<b>27</b>
2.1 Pojam i principi fiziološki zasnovanog farmakokinetičkog /biofarmaceutskog modelovanja .....	28
2.2 Primena u razvoju, proizvodnji i regulativi lekova.....	31
2.3 Kritički pristup razvoju, validaciji i primeni PBPK/PBBM modela.....	34
2.4 Biofarmaceutska klasifikacija lekova .....	36
2.5 <i>In vitro – in vivo</i> korelacija.....	38
<b>CILJ RADA .....</b>	<b>41</b>
<b>EKSPERIMENTALNI DEO.....</b>	<b>42</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>43</b>
3.1 Materijal.....	43
3.2 Metode .....	43
3.2.1 <i>In vivo</i> podaci.....	43
3.2.2 Konvencionalna farmakokinetička analiza.....	44
3.2.2.1 Metoda Wagner-Nelson.....	44
3.2.2.2 Metoda Loo-Riegelman.....	44
3.2.2.3 Numerička dekonvolucija.....	44
3.2.3 Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta.....	45
3.2.4 <i>In silico</i> ispitivanje.....	47
3.2.4.1 Simcyp® programski paket .....	47
3.2.4.2 GastroPlus™ programski paket.....	48
3.2.5 Uspostavljanje <i>in vitro-in vivo</i> korelacije .....	48
3.2.5.1 Dekonvolucioni pristup .....	48
3.2.5.2 Konvolucioni pristup .....	49

<b>4.1</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: PARACETAMOL</b> .....	<b>50</b>
4.1.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva paracetamola.....	50
4.1.2	<i>In vivo</i> podaci.....	51
4.1.3	Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila paracetamola dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda.....	51
4.1.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....	52
	Raspadljivost tableta .....	52
	Brzina rastvaranja paracetamola iz tableta.....	53
4.1.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....	53
4.1.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa ...	53
	Razvoj i validacija modela .....	53
	Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....	55
	Identifikacija profila apsorpcije paracetamola primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije .....	56
4.1.5.2	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa .....	57
	Identifikacija profila apsorpcije paracetamola primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije .....	58
4.1.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	60
	Dekonvolucioni pristup .....	60
	Konvolucioni pristup.....	62
<b>4.2</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: ACETILSALICILNA KISELINA</b> .....	<b>64</b>
4.2.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva acetilsalicilne kiseline .....	64
4.2.2	<i>In vivo</i> podaci.....	65
4.2.3	Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila acetilsalicilne kiseline dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda.....	65
4.2.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....	66
	Raspadljivost tableta .....	66
	Brzina rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta.....	66
4.2.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....	67
4.2.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa ...	68
	Razvoj i validacija modela .....	68
	Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....	69
	Identifikacija profila apsorpcije acetilsalicilne kiseline primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije .....	71
4.2.5.2	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa .....	71
	Identifikacija profila apsorpcije acetilsalicilne kiseline primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije .....	73
4.2.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	74
	Dekonvolucioni pristup .....	74
	Konvolucioni pristup.....	76
<b>4.3</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: AMLODIPIN-BESILAT</b> .....	<b>78</b>
4.3.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva amlodipina.....	78
4.3.2	<i>In vivo</i> podaci.....	79
4.3.3	Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila amlodipina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda.....	79
4.3.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....	80
	Raspadljivost tableta .....	80
	Brzina rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta .....	81
4.3.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....	81



4.3.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa ...82	
	Razvoj i validacija modela .....82	
	Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....83	
	Identifikacija profila apsorpcije amlodipina primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije .....84	
4.3.5.2	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa .....85	
	Identifikacija profila apsorpcije amlodipina primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije .....86	
4.3.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....88	
	Dekonvolucioni pristup .....88	
	Konvolucioni pristup .....89	
<b>4.4</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: IBUPROFEN .....91</b>	
4.4.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva ibuprofena.....91	
4.4.2	<i>In vivo</i> podaci.....92	
4.4.3	Identifikacija i uporedna analiza hipotetičkih <i>in vivo</i> input profila ibuprofena dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda.....93	
4.4.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....95	
	Raspadljivost tableta .....95	
	Brzina rastvaranja ibuprofena iz tableta.....96	
	Tablete sa trenutnim oslobađanjem (preparat I1).....96	
	Tablete sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa (I2) .....97	
	Tablete sa produženim oslobađanjem tipa lipofilnog matriksa (I3).....98	
4.4.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....100	
4.4.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa .100	
	Razvoj i validacija modela za preparate sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena .....101	
	.....101	
	Analiza osetljivosti parametara .....103	
	Razvoj i validacija modela za preparate sa produženim oslobađanjem ibuprofena .....105	
	.....105	
	Identifikacija profila apsorpcije ibuprofena primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije .....112	
	Tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena .....112	
	Tablete sa produženim oslobađanjem ibuprofena.....113	
4.4.5.2	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa .....114	
	.....114	
	Tablete sa trenutnim oslobađanjem.....114	
	Tablete sa produženim oslobađanjem .....116	
	Identifikacija profila apsorpcije ibuprofena primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije .....118	
	Tablete sa trenutnim oslobađanjem.....118	
	Tablete sa produženim oslobađanjem .....119	
4.4.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....121	
	Dekonvolucioni pristup .....121	
	Tablete sa trenutnim oslobađanjem.....121	
	Tablete sa produženim oslobađanjem .....122	
	Konvolucioni pristup.....127	
	Tablete sa trenutnim oslobađanjem.....127	
	Tablete sa produženim oslobađanjem .....127	
<b>4.5</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: NIMESULID .....130</b>	
4.5.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva nimesulida .....130	

4.5.2	<i>In vivo</i> podaci.....	131
4.5.3	Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila nimesulida dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda.....	131
4.5.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....	131
	Raspadljivost tableta .....	131
	Brzina rastvaranja nimesulida iz tableta .....	132
4.5.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....	133
4.5.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa .	133
	Razvoj i validacija modela .....	133
	Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....	135
	Identifikacija profila apsorpcije nimesulida primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije .....	137
4.5.5.2	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa .....	137
	Identifikacija profila apsorpcije nimesulida primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije .....	139
4.5.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	140
	Dekonvolucioni pristup.....	140
	Konvolucioni pristup.....	141
<b>4.6</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: KARBAMAZEPIN .....</b>	<b>144</b>
4.6.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva karbamazepina.....	144
4.6.2	<i>In vivo</i> podaci.....	145
4.6.3	Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila karbamazepina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda.....	145
4.6.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....	146
	Raspadljivost tableta .....	146
	Brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta.....	146
4.6.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....	147
4.6.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa .	147
	Razvoj i validacija modela .....	148
	Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....	149
	Identifikacija profila apsorpcije karbamazepina primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije .....	150
4.6.5.2	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa .....	151
	Identifikacija profila apsorpcije karbamazepina primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije .....	152
4.6.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	154
	Dekonvolucioni pristup.....	154
	Konvolucioni pristup.....	155
<b>4.7</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: METFORMIN-HIDROHLORID.....</b>	<b>157</b>
4.7.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva metformina .....	157
4.7.2	<i>In vivo</i> podaci.....	158
4.7.3	Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila metformina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda.....	158
4.7.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....	159
	Raspadljivost tableta .....	159
	Brzina rastvaranja metformin-hidrohlorida iz tableta .....	159
4.7.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....	162
4.7.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa .	163
	Razvoj i validacija modela .....	163

	Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....	166
	Identifikacija profila apsorpcije metformina primenom Simcyp <sup>®</sup> gastrointestinalne simulacije .....	168
4.7.5.2	Gastrointestinalana simulacija korišćenjem GastroPlus <sup>™</sup> programskog paketa .....	170
	Identifikacija profila apsorpcije metformina primenom GastroPlus <sup>™</sup> gastrointestinalne simulacije .....	172
4.7.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	173
	Dekonvolucioni pristup.....	173
	Konvolucioni pristup.....	176
<b>4.8</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: RANITIDIN-HIDROHLORID.....</b>	<b>178</b>
4.8.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva ranitidina.....	178
4.8.2	<i>In vivo</i> podaci.....	179
4.8.3	Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila ranitidina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda .....	179
4.8.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....	180
	Raspodljivost tableta .....	180
	Brzina rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz tableta .....	181
4.8.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....	182
4.8.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp <sup>®</sup> programskog paketa .	182
	Razvoj i validacija modela .....	182
	Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....	184
	Identifikacija profila apsorpcije ranitidina primenom Simcyp <sup>®</sup> gastrointestinalne simulacije .....	186
4.8.5.2	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus <sup>™</sup> programskog paketa .....	187
	Identifikacija profila apsorpcije ranitidina primenom GastroPlus <sup>™</sup> gastrointestinalne simulacije .....	189
4.8.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	191
	Dekonvolucioni pristup.....	191
	Konvolucioni pristup.....	193
<b>4.9</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: ATENOLOL.....</b>	<b>196</b>
4.9.1	Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva atenolola .....	196
4.9.2	<i>In vivo</i> podaci.....	197
4.9.3	Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila atenolola dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda .....	197
4.9.4	<i>In vitro</i> ispitivanja.....	198
	Raspodljivost tableta .....	198
	Brzina rastvaranja atenolola iz tableta .....	199
4.9.5	<i>In silico</i> ispitivanja.....	200
4.9.5.1	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp <sup>®</sup> programskog paketa ...	200
	Razvoj i validacija modela .....	200
	Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....	202
	Identifikacija profila apsorpcije atenolola primenom Simcyp <sup>®</sup> gastrointestinalne simulacije .....	203
4.9.5.2	Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus <sup>™</sup> programskog paketa .....	204
	Identifikacija profila apsorpcije atenolola primenom GastroPlus <sup>™</sup> gastrointestinalne simulacije .....	205
4.9.6	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	206
	Dekonvolucioni pristup.....	206

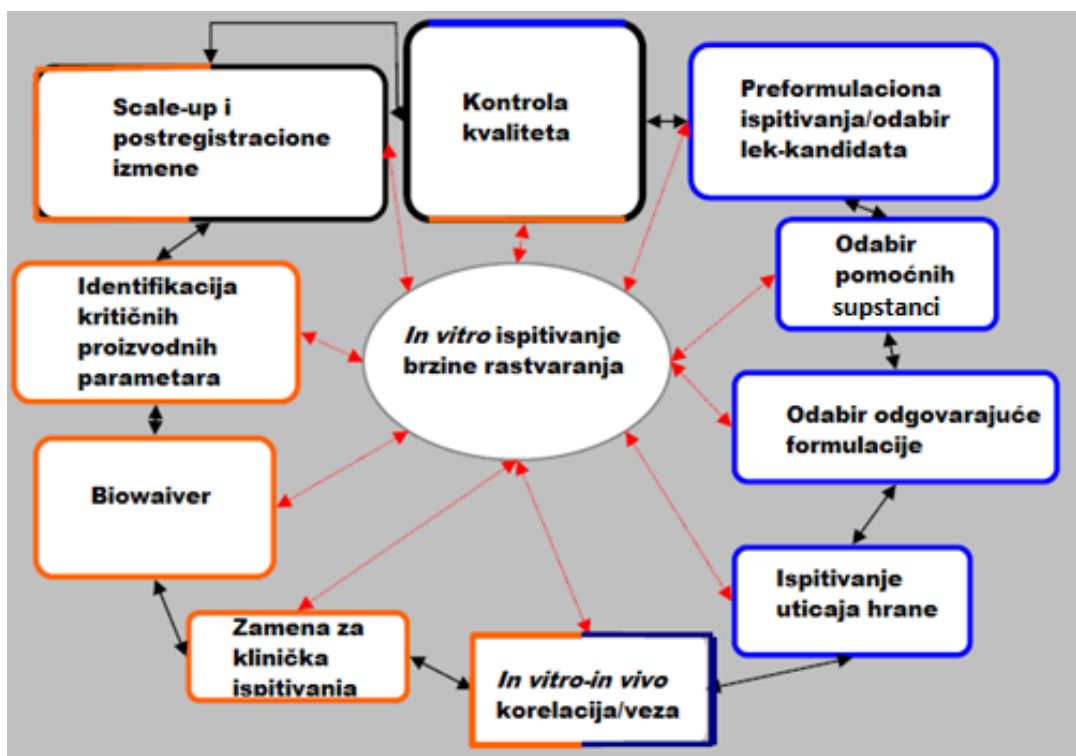
Konvolucioni pristup.....	209
<b>4.10 MODEL SUPSTANCA: CIPROFLOKSACIN-HIDROHLORID.....</b>	<b>211</b>
4.10.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva ciprofloksacina .....	211
4.10.2 <i>In vivo</i> podaci.....	212
4.10.3 Identifikacija i uporedna analiza <i>in vivo</i> input profila ciprofloksacina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda .....	212
4.10.4 <i>In vitro</i> ispitivanja.....	213
Raspadljivost tableta .....	213
Brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta .....	214
4.10.5 <i>In silico</i> ispitivanja.....	215
4.10.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa ..	216
Razvoj i validacija modela .....	216
Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje.....	218
Identifikacija profila apsorpcije ciprofloksacina primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije .....	220
4.10.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa .....	221
Identifikacija profila apsorpcije ciprofloksacina primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije .....	223
4.10.6 <i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	225
Dekonvolucioni pristup .....	225
Konvolucioni pristup.....	227
<b>5. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOBIJENIH ZA RAZLIČITE MODEL SUPSTANCE .....</b>	<b>229</b>
<b>5.1 <i>In vitro</i> brzina rastvaranja lekovite supstance iz tableta.....</b>	<b>229</b>
<b>5.2 Hipotetički <i>in vivo</i> input profili .....</b>	<b>231</b>
<b>5.3 <i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....</b>	<b>233</b>
<b>5.4 Biofarmaceutske karakteristike ispitivanih model supstanci .....</b>	<b>233</b>
<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>236</b>
<b>PRILOG 1 .....</b>	<b>240</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>243</b>

# OPŠTI DEO

# 1. Mogućnost predviđanja *in vivo* ponašanja leka na osnovu rezultata *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata

## 1.1 Osnovni pojmovi i značaj

Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata prepoznato je kao jedan od najznačajnijih testova koji se koristi za biofarmaceutsku karakterizaciju lekova u različitim fazama životnog ciklusa leka, počev od razvoja formulacije, optimizacije proizvodnog procesa, preko kontrole kvaliteta, ispitivanja stabilnosti, predviđanja *in vivo* ponašanja leka (biološka raspoloživost i biološka ekvivalencija različitih preparata), kao i tokom praćenja postregistracionih izmena leka (slika 1). Zbog značajne uloge koju ovo ispitivanje ima u ukupnom razvojnom procesu leka, a naročito iz aspekta njegovih kliničkih performansi, sve su veći zahtevi i očekivanja koja se postavljaju prilikom optimizacije metode za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata.



Slika 1. Centralna uloga *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja u različitim fazama razvojnog ciklusa leka (plavi okvir-rana faza razvoja; narandžasti okvir-kasna faza razvoja; crni okvir-postregistraciona faza) (preuzeto iz Scheubel, 2010)

Tokom protekle tri decenije, ispitivanje brzine rastvaranja evoluiralo je od relativno jednostavne metode, koja se rutinski koristi u kontroli kvaliteta finalnog proizvoda, u sveobuhvatni skup alata koji se može primeniti u različitim fazama životnog ciklusa leka. U skladu sa novim zahtevima i očekivanjima, danas se u literaturi mogu sresti brojni termini kojima se opisuje metoda za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata, kao što su „biorelevantna“, „bioprediktivna“, „klinički relevantna“ i

„diskriminativna“. Ove termini se u literaturi često koriste naizmenično i nedosledno, te se nameće potreba za harmonizacijom terminologije.

Ispitivanje brzine rastvaranja našlo je širu upotrebu sa razvojem standardnih aparatura 70-tih godina prošlog veka i sa usvajanjem Smernica za ispitivanje brzine rastvaranja od strane Američke agencije za hranu i lekove 1997. godine (FDA, 1997). Prvobitno, izbor metode za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja koja će ukazati na *in vivo* ponašanje leka nije predstavljalo veliki izazov, s obzirom da je većina lekovitih supstanci pokazivala visoku rastvorljivost (u skladu sa kriterijumima za klasu 1 ili 3 Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS), i koristile su se relativno jednostavne formulacije u vidu tableta sa trenutnim oslobađanjem i kapsula. Sa druge strane, bio je dostupan manji broj aparatura i medijuma za ispitivanje. Jednostavni vodeni puferi sa fiziološkom pH vrednošću, kao što su hlorovodonična kiselina pH 1,2 ili fosfatni pufer pH 6,8, su vrlo često davali zadovoljavajući stepen biorelevatnosti (FDA, 2017; Sheng i sar, 2009).

Tokom prethodne dve decenije, broj lek-kandidata sa niskom rastvorljivošću je značajno povećan, tako da danas većina novih lekovitih supstanci pripada klasi 2 BCS (Wu i Benet, 2005). Razvoj novih lekovitih supstanci značajno je doprineo unapređenju terapije, ali je doneo značajne izazove za razvoj formulacija sa odgovarajućom biološkom raspoloživosti i razvoj metoda za ispitivanje i karakterizaciju lekovitih preparata. Ovi izazovi doveli su do inovacija u razvoju različitih farmaceutskih oblika i farmaceutsko-tehnoloških postupaka za proizvodnju lekova, kao što su amorfne čvrste disperzije, lipidne formulacije, inženjering čestica i drugo (Leuner i Dressman, 2000; Merisko-Liversidge i sar, 2003; O'Driscoll i Griffin, 2008). Ovaj vid tehnološkog napretka u farmaceutskoj industriji doveo je i do inovacija u oblasti ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata kako bi se omogućilo predviđanje *in vivo* ponašanje leka. To je dovelo do razvoja novih uređaja i medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu (GIT), do boljeg razumevanja procesa koji prate rastvaranje lekovite supstance, kombinovanja *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i *in silico* modelovanja i uspostavljanja korelacije između *in vitro* i *in vivo* rezultata (Boetker i sar, 2011; Jantratid i sar, 2008; Reppas i sar, 2014;).

### **Ispitivanje brzine rastvaranja u kontroli kvaliteta lekova**

Svrha ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata u kontroli kvaliteta lekova je otkrivanje odstupanja/devijacija koje mogu negativno uticati na performanse proizvoda. Metode koje se koriste za rutinsku kontrolu kvaliteta bi trebalo da budu robusne i jednostavne kako bi se mogle primenjivati rutinski. Shodno tome, u kontroli kvaliteta uglavnom se koriste konvencionalna aparatura sa lopaticom ili korpicom pod eksperimentalnim uslovima koji su definisani tokom razvoja proizvoda. Ovi uslovi podrazumevaju izbor pH vrednosti i sastava medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja, razmatranje potrebe dodatka sintetskih surfaktanata, kao i odgovarajući stepen agitacije, odnosno hidrodinamičke uslove.

Ispitivanje brzine rastvaranja kao alat za kontrolu kvaliteta lekova široko se primenjuje i, uz izvesne razlike, postoji opšti konsenzus u pogledu zahteva različitih regulatornih agencija. Ovo se može pripisati činjenici da su uređaji, kao i eksperimentalni uslovi koji se koriste za ispitivanje standardizovani i usklađeni. Uglavnom se koriste standardni uređaji kao što su aparatura sa lopaticom ili korpicom uz primenu 500-900 ml vodenih pufera kao medijuma, pri brzini rotacije 50-75 rpm za aparaturu sa lopaticom, odnosno 50-100 rpm za aparaturu sa korpicom (EMA, 2020).

## **Biorelevantne metode za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata**

Razvoj biorelevantne metode za ispitivanje brzine rastvaranja podrazumeva što verniju simulaciju fizioloških uslova koji postoje na mestu primene, oslobađanja i apsorpcije lekovite supstance. Za lekove koji se primenjuju peroralno, značajna je simulacija uslova u gastrointestinalnom traktu. Biorelevantna metoda za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata često podrazumeva korišćenje nestandardnih eksperimentalnih uslova koji podrazumevaju primenu fiziološki zasnovanih medijuma, dvofaznih medijuma, dinamičkih višeprostornih uređaja ili modela koji istovremeno simuliraju proces rastvaranja i apsorpcije.

Razvoj biorelevantne metode za ispitivanje brzine rastvaranja zasniva se na principu da je s ciljem predviđanja *in vivo* ponašanja leka neophodno što približnije simulirati kompleksne uslove koji postoje u GIT-u. U skladu sa tim, razvijene su različite *in vitro* metode koje podrazumevaju složene dinamičke modele GIT-a uz primenu fiziološki zasnovanih medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja (Blanquet i sar, 2004; Carino i sar, 2006; Dressman i sar, 1998; Jantratid i sar, 2008; Kataoka i sar, 2003; Mercuri i sar, 2008; Tsume i sar, 2013; Vertzoni i sar, 2005).

### ***In vitro* metode ispitivanja brzine rastvaranja koja omogućavaju predviđanje *in vivo* ponašanja leka**

Razvoj *in vitro* metode za ispitivanja brzine rastvaranja koja omogućava predviđanje *in vivo* ponašanja leka, takozvane bioprediktivne metode (engl. *in vivo* *predictive dissolution*, iPD) zasnovan je na poznavanju faktora od kojih zavisi brzina rastvaranja lekovite supstance iz preparata i podrazumeva uspostavljanje veze između *in vitro* i *in vivo* podataka (Grady i sar, 2018). Eksperimentalni uslovi koji omogućavaju predviđanje *in vivo* ponašanja leka bi trebalo da omoguće procenu uticaja različitih faktora formulacije i procesnih parametara na kliničke performanse leka, kao i identifikaciju klinički relevantnih specifikacija. Kada se uspostavi validna *in vitro* – *in vivo* korelacija, iPD omogućava predviđanje *in vivo* brzine rastvaranja. Razvoj iPD metode se može zasnivati na primeni biorelevantnih eksperimentalnih uslova, ali se mogu koristiti i jednostavniji eksperimentalni uslovi ukoliko je pokazano da razvijena metoda i kriterijumi prihvatljivosti mogu da potvrde ili predvide klinički učinak leka (Grady i sar, 2018; Hermans i sar, 2017; McAllister i sar, 2019).

Različiti termini i definicije koje se koriste za *in vitro* metode ispitivanja brzine rastvaranja ne isključuju jedna drugu, odnosno metode ispitivanja brzine rastvaranja za kontrolu kvaliteta i biorelevantne metode mogu biti ujedno i klinički relevantne ukoliko se pokaže da je uspostavljena korelacija/veza između *in vitro* i *in vivo* podataka (Grady i sar, 2018). Iako bi bilo poželjno da se ista metoda, koja je bioprediktivna, koristi i za kontrolu kvaliteta i za biofarmaceutsku karakterizaciju preparata, ovo još uvek nije postignuto u praksi.

Veliki izazov u razvoju metode za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata predstavlja dokazivanje odgovarajućeg nivoa diskriminativne moći. Diskriminativna moć metode za ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata reflektuje sposobnost metode da identifikuje razlike između različitih proizvoda ili različitih serija istog proizvoda, koje bi se u kliničkim uslovima ispoljile kao odsustvo terapijske ekvivalentnosti, odnosno koje nisu međusobno biološki ekvivalentne. Sa druge strane, ako razvijena metoda za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja ukazuje na razlike među formulacijama sa dokazanom bioekvivalentnošću, smatra se da je metoda previše diskriminativna (Gray, 2018).



## 1.2 Razvoj bioprediktivne i diskriminativne metode za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata

Razvoj bioprediktivne i diskriminativne metode za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja podrazumeva izbor odgovarajućih eksperimentalnih uslova ispitivanja, odnosno vrste i zapremine medijuma, vrste uređaja, stepena agitacije, kao i eksperimentalnog protokola ispitivanja koji omogućavaju predviđanje *in vivo* ponašanja leka i identifikaciju klinički značajnih specifikacija.

Što se tiče izbora medijuma, veliki napredak učinjen je nakon detaljnih ispitivanja sastava i zapremine gastrointestinalnih tečnosti što je rezultovalo razvojem fiziološki zasnovanih biorelevantnih medijuma. Razvoj fiziološki zasnovanih medijuma započeo je 90-tih godina prošlog veka i do danas je formulisan veći broj medijuma koji simuliraju sadržaj u različitim delovima GIT-a u uslovima na gladno i nakon uzimanja obroka (Dressman i sar, 1998; Jantratid i sar, 2008; Vertzoni i sar, 2005). Ovi medijumi se međusobno razlikuju u pogledu pH vrednosti, sadržaja elektrolita i prirodnih surfaktanata (žučne soli, lecitin), a u skladu sa tim i stepenu u kome simuliraju sadržaj u GIT-u, a kako istraživanja u ovoj oblasti daju nove podatke i njihov sastav se unapređuje kako bi se što bliže simulirali fiziološki uslovi.

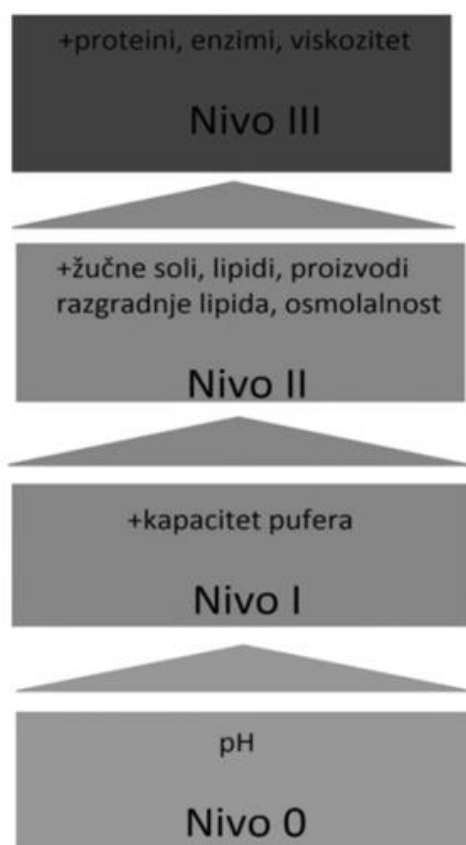
Dressman i saradnici su 1998. godine predstavili biorelevantne medijume koji simuliraju intestinalnu tečnost na gladno (engl. *Fasted State Simulated Intestinal Fluid*, FaSSIF) i nakon obroka (engl. *Fed State Simulated Intestinal Fluid*, FeSSIF). Njihov sastav se uglavnom bazirao na rezultatima ispitivanja sastava humanih aspirata dobijenih nakon primene tečnih obroka. Sastav prvobitnih medijuma je kasnije delimično izmenjen u cilju unapređenja njihove biorelevantnosti i fizičke stabilnosti (FaSSIF-V2 i FeSSIF-V2), a predstavljen je i novi medijum koji simulira želudačnu tečnost u postprandijalnim uslovima (engl. *Fed State Simulated Gastric Fluid*, FeSSGF) (Jantratid i sar, 2008). Vertzoni i saradnici su 2005. godine objavili sastav medijuma koji simulira želudačnu tečnost u preprandijalnim uslovima (engl. *Fasted State Simulated Gastric Fluid*, FaSSGF), a 2010. godine su predložili sastav medijuma koji simulira fizičko-hemijske karakteristike preprandijalne i postprandijalne tečnosti u kolonu (engl. *Fasted State Simulated Colonic Fluid*, FaSSCoF i *Fed State Simulated Colonic Fluid*, FeSSCoF). Silva i sar (2019) nedavno su istakli da se medijumi zasnovani na korišćenju fosfatnog pufera ne mogu smatrati biorelevantnim s obzirom da je on u vrlo malom procentu zastupljen u gastrointestinalnim tečnostima, te su predložili upotrebu bikarbonatnog pufera kako bi se adekvatno simulirao sastav gastrointestinalnih tečnosti.

Međutim, nameće se pitanje da li je uvek neophodno koristiti tako složene medijume, sa kojima je vrlo zahtevno manipulirati, koji zahtevaju složene analitičke metode, često su nestabilni, a pritom imaju i visoku cenu. Dosadašnja istraživanja ukazuju da složenost medijuma koja je neophodna za ispitivanje brzine rastvaranja zavisi od karakteristika lekovite supstance, farmaceutskog oblika leka, načina doziranja, ali i od toga koje informacije istraživač želi da dobije izvođenjem ispitivanja. Markopoulos i sar. (2015) predložili su i definisali četiri nivoa složenosti medijuma za izvođenje *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja u zavisnosti od postavljenih ciljeva. Na slici 2 dat je šematski prikaz predloženih nivoa složenosti medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja.

**Nulti nivo** odnosi se na medijume kod kojih pH vrednost odgovara fiziološkim vrednostima dok se ostali parametri ne razmatraju. Tu spadaju, pre svega, prečišćena voda i rastvori pufera čija se pH vrednost nalazi u fiziološkim granicama. Puferski kapacitet može, ali i ne mora da bude fiziološki relevantan, jer je cilj, pre svega, održavanje određene pH vrednosti u toku ispitivanja. Istraživanja pokazuju da medijumi koji pripadaju ovom nivou složenosti daju odgovarajuće rezultate kod ispitivanja brzine rastvaranja preparata sa trenutnim oslobađanjem lekovitih supstanci koje pripadaju BCS klasi 1 i 3 (Avdeef i sar, 2016).

**Prvi nivo** odnosi se na medijume kod kojih, osim pH vrednosti, i kapacitet pufera odgovara fiziološkim vrednostima. Razlikuju se medijumi koji simuliraju stanje na gladno i nakon obroka. Ovi medijumi se u literaturi najčešće označavaju prefiksom „b“ kao *blank*, odnosno „prazni“, što se odnosi na činjenicu da ne sadrže žučne soli i lecitin. Ovi medijumi pokazali su se adekvatnim za predviđanje *in vivo* ponašanja visoko rastvorljivih lekovitih supstanci, gde se očekuje samo minimalan uticaj lipida i žučnih soli na brzinu rastvaranja (Markopoulos i sar, 2015; Pentafragka i sar, 2020; Sakamoto i sar, 2021).

**Drugi nivo** obuhvata medijume koji u pogledu pH vrednosti, puferskog kapaciteta, osmolalnosti, prisustva žučnih soli, lipida i proizvoda varenja lipida, simuliraju gastrointestinalne tečnosti. Medijumi ovog nivoa složenosti najčešće nalaze primenu kod predviđanja *in vivo* ponašanja nisko rastvorljivih lekovitih supstanci BCS klase 2 i 4 (Fagerberg i Bergström, 2015; Madsen i sar, 2018; Markopoulos i sar, 2015).



Slika 2. Šematski prikaz koncepta nivoa složenosti fiziološki zasnovanih medijuma za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja (preuzeto iz Markopoulos i sar, 2015)

**Treći nivo** podrazumeva medijume koji simuliraju gastrointestinalne tečnosti uzimajući u obzir pH vrednost, puferski kapacitet, osmolalnost, sadržaj žučnih soli, sadržaj lipida i proteina hrane, produkata njihovog varenja i viskozitet. Smatra se da bi medijumi ove grupe najveći potencijal mogli naći prilikom ispitivanja lipidnih formulacija (Swarnakar i sar, 2019).

Sa druge strane, imajući u vidu složenu hidrodinamiku GIT-a, ograničenu zapreminu, kao i variranje sastava GI tečnosti, ne iznenađuje činjenica da se *in vivo* ponašanje ne može jednostavno predvideti na osnovu najčešće korišćenih oficinalnih uređaja za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja. Dizajn ovih uređaja nije se značajno menjao još od 70-tih godina prošlog veka, a njihovu širu upotrebu u razvoju lekova ograničavaju brojni nedostaci:

- nedostatak fleksibilnosti prilikom izmene medijuma,
- korišćenje velikih zapremina medijuma koje ne odgovaraju fiziološkim,
- hidrodinamički uslovi koji ne odgovaraju fiziološkim, i značajno variraju unutar suda u kome se vrši ispitivanje,
- efekat „kupe“ koji se može javiti u aparaturi sa lopaticom čime se stvara tzv. „mrtva“ zona ispod lopatice u kojoj nema rastvaranja (Kostewicz i sar, 2014; Scheubel, 2010).

Razvoj savremenih farmaceutskih oblika lekova, koji se ne mogu na odgovarajući način okarakterisati primenom standardnih uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja, kao i potreba za boljim predviđanjem *in vivo* profila brzine rastvaranja i apsorpcije lekova, dovela je do intenzivnih istraživanja vezanih za razvoj unapređenih modela za ispitivanje brzine rastvaranja. Ovi modeli se često opisuju kao dinamički modeli za ispitivanje brzine rastvaranja, a pregled najčešće korišćenih uređaja može se naći u radovima Kostewicz i sar (2014), Butler i sar (2019) i Shrivastava i sar (2019).

**Model veštačkog želuca i duodenuma** (engl. *Artificial Stomach-Duodenum Model*, ASD) predstavlja kompjuterski kontrolisan dinamički model za ispitivanje brzine rastvaranja koji su razvili Carino i sar (2006). Kao što i sam naziv ukazuje uređaj se sastoji iz dve komore od kojih jedna simulira želudac a druga duodenum. Uređaj omogućava simulaciju sekrecije u želucu i duodenumu, kao i brzinu pražnjenja želuca.

S obzirom da se kod lekovitih supstanci niske i pH-zavisne rastvorljivosti u fiziološkom opsegu pH vrednosti očekuje značajan uticaj pH vrednosti želudačnog soka i brzine pražnjenja želuca, ovaj uređaj se posebno pokazao korisnim u ispitivanju lekovitih supstanci subklase 2a i 2b BCS (Carino i sar, 2006; 2010; Polster i sar, 2010; 2015). Bioprediktivna moć ovog uređaja ograničena je time što ne omogućava simulaciju apsorpcije (Bhattachar i sar, 2011).

**Dinamički model želuca** (engl. *Dynamic Gastric Model*, DGM) predstavlja dinamički model za ispitivanje brzine rastvaranja koji je razvijen u Institutu za proučavanje hrane u Velikoj Britaniji. Uređaj se sastoji iz dva dela: gornjeg, koji simulira mešanje i sekretornu aktivnost u fundusu, i donjeg, koji simulira složenu hidrodinamiku u antrumu (Mercuri i sar, 2008).

Brojne studije ukazuju da hidrodinamički uslovi DGM modela odgovaraju *in vivo* uslovima u želucu (Marciani i sar, 2001; Vardakou i sar, 2011). Mann i Pygall (2012) poredili su performanse jednoslojnih i dvoslojnih tableta korišćenjem ovog modela kao i aparature sa lopaticom. Rezultati dobijeni korišćenjem DGM modela odgovaraju rezultatima dobijenim *in vivo* i ukazuju na veću bioprediktivnu moć ovog modela u poređenju sa aparaturom sa lopaticom. Posebno se ističe veliki potencijal ovog uređaja u ispitivanju gastroretentivnih preparata, dok se kao nedostaci navode cena i kompleksnost uređaja.

**Dvofazni model rastvaranja** (engl. *Biphasic Dissolution System*) zasniva se na ispitivanju brzine rastvaranja korišćenjem dve faze koje se međusobno ne mešaju, od kojih je jedna vodena faza, a druga, organski rastvarač. Levy i sar. (1965) predložili su ovakav sistem u kome se rastvaranje lekovite supstance odvija u vodenoj fazi, koja se protom raspodeljuje između vodene faze i organskog rastvarača u zavisnosti od lipofilnih karakteristika. Na ovaj način simulira se apsorpcija lekovite supstance i obezbeđuju se *sink* uslovi u medijumu za ispitivanje brzine rastvaranja. Organski rastvarač bira se na osnovu rastvorljivosti lekovite supstance, a najčešće korišćeni je oktanol, s obzirom da najveći broj lekovitih supstanci pokazuje odgovarajuću rastvorljivost u oktanolu, a oktanol takođe pokazuje i druge zadovoljavajuće osobine neophodne za izvođenje eksperimenata (ne meša se sa vodom, ne isparava na 37°C i td.) (Heigoldt i sar, 2010). Ispitivanje se najčešće izvodi u aparaturi sa lopaticom odnosno korpicom i u literaturi se mogu naći brojni primeri upotrebe ovog modela u ispitivanju brzine rastvaranja nisko rastvorljivih lekovitih supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika (Heigoldt i sar, 2010; Gabriels i sar, 2004; Grundy i sar, 1997). Model omogućava istovremeno praćenje brzine rastvaranja,

apsorpcije i precipitacije nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, ali širu upotrebu ograničava veoma složena eksperimentalna postavka.

**Model rastvaranja i permeacije** (engl. *Dissolution/Permeation Model*, D/P model) razvijen je sa ciljem istovremenog praćenja brzine rastvaranja i apsorpcije (Kataoka i sar, 2003). Model se sastoji od dve komore od kojih je jedna donorska a druga akceptorska. Komore razdvaja pregrada koja ima za cilj da simulira zid GIT-a, a kao pregrada mogu se koristiti veštačke membrane ili žive ćelijske kulture.

D/P model uspešno je korišćen za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije nisko rastvorljive lekovite supstance danazola (Kataoka i sar, 2006). Rezultati ispitivanja su pokazali da se može postići zadovoljavajuća korelacija *in vitro* i *in vivo* rezultata na gladno i nakon obroka. D/P model je takođe uspešno korišćen u predviđanju uticaja hrane (Kataoka i sar, 2006), dozno-zavisne farmakokinetike (Kataoka i sar, 2013), kao i uticaja varijacija formulacije na apsorpciju nisko rastvorljivih lekovitih supstanci (Kataoka i sar, 2012; Mizoguchi i sar, 2018). Glavni nedostaci ovog modela su niska reproduktivnost, naročito u slučaju upotrebe živih ćelijskih kultura, odsustvo prostora koji bi simulirao želudac i cena.

**Simulator gastrointestinalnog trakta** (engl. *Gastrointestinal Tract Simulator*, GIS) predstavlja troprostorni dinamički model za ispitivanje brzine rastvaranja koji su razvili Tsume i sar (2013) i Takeuchi i sar (2014). Ovaj višeprostorni uređaj za ispitivanje brzine rastvaranja sastoji se iz tri komore koje simuliraju želudac, duodenum i jejunum. Komore su međusobno povezane peristaltičkim pumpama koje omogućavaju simulaciju različitih vremena zadržavanja u želucu i duodenumu.

Uređaj je uspešno korišćen u predviđanju supersaturacije pioglitazona, nisko rastvorljive lekovite supstance subklase 2b BCS (Tsume i sar, 2013). Isti autori ispitivali su mogućnost predviđanja lek-lek interakcija lekovite supstance dasatiniba (subklasa 2b) i inhibitora protonske pumpe upotrebom GIS uređaja. Pri povišenim vrednostima pH želuca dolazi do značajnog smanjenja brzine rastvaranja dasatiniba, te je dobijena dobra korelacija sa *in vivo* podacima (Tsume i sar, 2015). Psachoulas i sar (2011) koristili su rezultate ispitivanja brzine rastvaranja u GIS modelu kao ulazne parametre za fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje i postigli odlično slaganje simuliranih i *in vivo* profila koncentracije lekovite supstance u plazmi. Prednosti ovog modela ogledaju se u jednostavnom dizajnu i rukovanju u poređenju sa drugim dinamičkim modelima za ispitivanje brzine rastvaranja, dok je glavni nedostatak odsustvo simulacije apsorpcije, odnosno *sink* uslova.

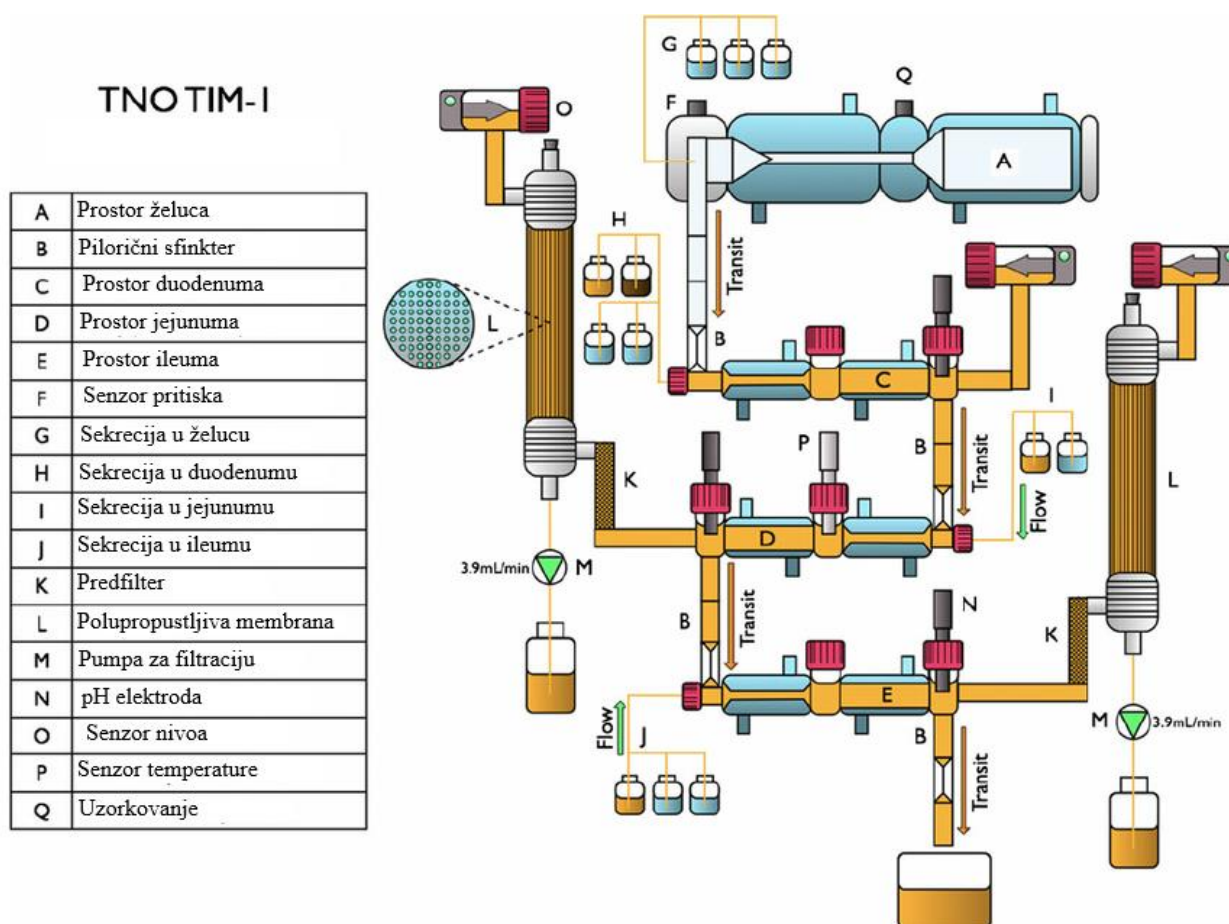
**Simulator gastrointestinalnog trakta TNO TIM-1/2** (engl. *The Netherlands Organization for Applied Scientific Research gastrointestinal model 1/2*, ) predstavljaju računarski kontrolisane dinamičke modele za ispitivanje brzine rastvaranja koji su razvijeni u TNO istraživačkom centru u Holandiji i validirani na osnovu ispitivanja na ljudima i životinjama (Blanquet i sar, 2004). U početku su modeli korišćeni za ispitivanja u oblasti hrane, naročito vezano za ispitivanje biološke raspoloživosti minerala, vitamina i mutagena poreklom iz hrane, da bi se kasnije njihova primena proširila.

Gastrointestinalni model TIM-1 simulira fiziološke uslove u želucu i tankom crevu, dok TIM-2 model predstavlja debelo crevo sa bogatom mikrobiološkom florom. Šematski prikaz gastrointestinalnog modela TIM-1 prikazan je na slici 3.

TIM-1 sistem simulira dinamičke uslove u gornjim delovima GI trakta u pogledu temperature, pH vrednosti, prisustva GI tečnosti (saliva, želudačni i pankreasni sok, uključujući enzime i žučne soli), peristaltičkih pokreta, vremena prolaska kroz GI trakt i uklanjanja proizvoda varenja. GI parametri se mogu prilagoditi tako da simuliraju specifične uslove vezano za uzrast, vrstu obroka i prisustvo specifičnih oboljenja (Blanquet i sar, 2004). TIM-2 sistem

simulira uslove u debelom crevu u pogledu pH vrednosti, metabolički aktivne mikroflore humanog porekla i preuzimanja sastojaka iz lumena tankog creva.

Blanquet i sar. (2004) i Souliman i sar. (2006, 2007) ispitivali su uticaj variranja vremena zadržavanja u različitim delovima GI trakta i uticaj hrane na brzinu rastvaranja i apsorpciju paracetamola iz preparata sa trenutnim i odloženim oslobađanjem korišćenjem TIM-1 modela. Studije su pokazale da profili dobijeni *in vitro* odgovaraju *in vivo* rezultatima. Takođe je pokazan negativan uticaj hrane na apsorpciju paracetamola što je u korelaciji sa *in vivo* rezultatima gde je uočeno niže  $C_{max}$  i odloženo  $t_{max}$  u stanju sitosti u poređenju sa uzimanjem leka na gladno. U naučnoj literaturi se mogu naći i brojni drugi primeri istraživanja sa sistemima TIM-1 i TIM-2 u svrhu predviđanja apsorpcije lekova i potencijalnih efekata hrane koji ukazuju na mogućnost adekvatnog predviđanja *in vivo* ponašanja lekova i uspostavljanja *in vitro* – *in vivo* korelacije (Brouwers i sar, 2011; Brouwers i Augustijns, 2014; Dickinson i sar, 2012).

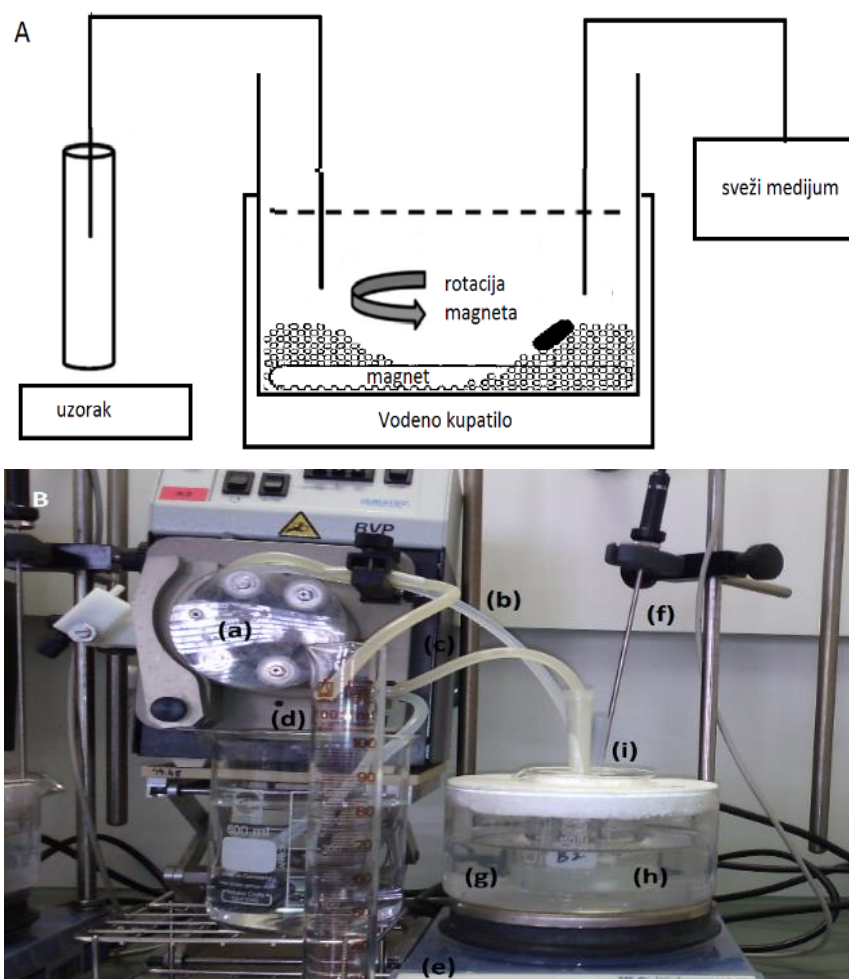


Slika 3. Šematski prikaz gastrointestinalnog modela TIM-1 (preuzeto iz Dickinson i sar, 2012)

Međutim, upotreba ovih modela za rutinska ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz čvrstih farmaceutskih oblika je nepraktična zbog velike složenosti opisanih modela, te cene i dužine trajanja testa. Da bi se proces simulacije donekle pojednostavio, razvijen je pojednostavljeni dinamički dvoprostorni tiny-TIM sistem, koji se sastoji od želudačnog odeljka i jednog, umesto tri odeljka za tanko crevo. Pored toga, konvencionalni želudačni odeljak je optimizovan razvojem TIM naprednog gastričnog odeljka (eng. *TIM advanced gastric compartment*, TIMage), koji bolje simulira oblik i dinamičke uslove želuca uzimajući u obzir njihov tonus, antralno mešanje i otvaranje pilorusa (Butler i sar, 2019; Bellmann i sar, 2016; Van Den Abell i sar, 2016). Nedavne studije ukazuju na veliki potencijal tiny-TIM sistema u izboru odgovarajuće fomulacije prilikom razvoja farmaceutskog oblika leka (Schilderink i sar, 2020), pri uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije i predviđanju kliničkog učinka leka (Chiang i sar,

2022), predviđanju uticaja različitih fizioloških uslova na oslobađanje lekovite supstance (Mármol i sar, 2022) kao i simulaciji lek-lek i lek-hrana interakcija (Liu i sar, 2021).

Bogataj i sar. (2010) razvili su aparaturu sa staklenim kuglicama (engl. *glass-bead device*) koja omogućava fizički kontakt i pokretanje preparata na površini staklenih kuglica. Uređaj predstavlja dinamički model za ispitivanje brzine rastvaranja koji funkcioniše po principu otvorenog protočnog sistema (slika 4) gde kontinuirani protok medijuma obezbeđuje peristaltička pumpa na koju su povezane dve cevi, jedna koja u sud za ispitivanje neprestano uvodi svež medijum, a druga preko koje se vrši uzorkovanje u definisanim vremenskim intervalima. Odgovarajuće hidrodinamičke uslove obezbeđuje okretanje magneta koji pokreće staklene kuglice dijametra 1 mm koje potom pokreću preparat koji je na njihovoj površini. Različiti hidrodinamički uslovi mogu se postići koristeći različitu količinu kuglica i/ili brzinu obrtanja magneta (Bogataj i sar, 2015).

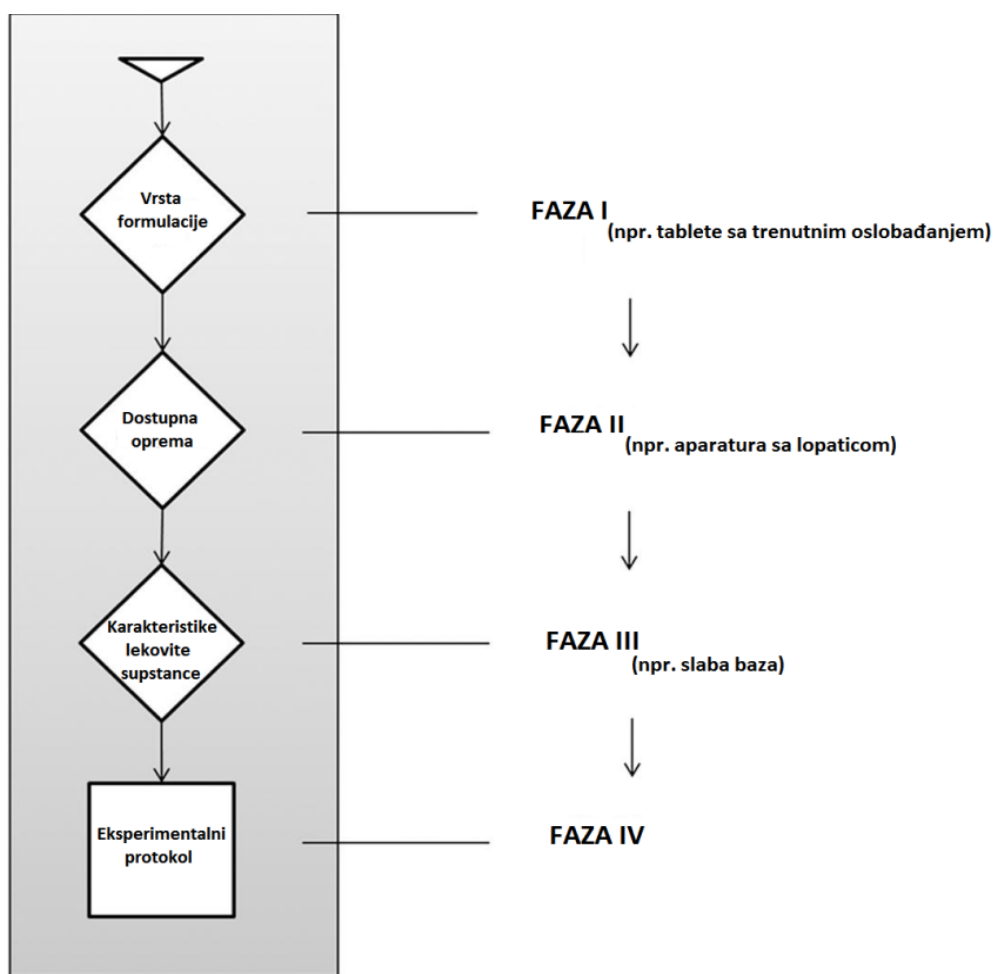


Slika 4. Aparatura sa staklenim kuglicama. A: šematski prikaz uređaja, B: fotografija uređaja: (a) peristaltička pumpa, (b) cev za dovoz svežeg medijuma, (c) cev za uzorkovanje, (d) menzura za sakupljanje uzorka, (e) magnetna mešalica sa grejačem, (f) termometar, (g) vodeno kupatilo, (h) magnet i staklene kuglice, (i) sud u kome se vrši ispitivanje

Klein i sar. (2013) poredili su rezultate ispitivanja brzine rastvaranja diklofenaka iz peleta sa produženim oslobađanjem u BioDis aparaturi, stres test uređaju i aparaturi sa staklenim kuglicama. Kod ispitivanja u aparaturi sa staklenim kuglicama korišćena je eksperimentalna postavka gde je 25 g staklenih kuglica dodato u sud za ispitivanje, a brzina okretanja magneta podešena na 50 obrtaja u minuti. Navedeni uređaji su odabrani zbog mogućnosti da simuliraju

različito vreme zadržavanja peleta u želucu, s obzirom da je ovaj parametar pokazao veliki uticaj na brzinu rastvaranja diklofenaka. Veoma slični rezultati dobijeni su u BioDis aparaturi i stres test uređaju i oni su bili u korelaciji sa *in vivo* ponašanjem peleta diklofenaka. U aparaturi sa staklenim kuglicama dobijeno je mnogo brže oslobađanje te je zaključeno da su primenjeni hidrodinamički uslovi isuviše intenzivni da bi simulirali fiziološke uslove u GIT-u. Uprkos velikom potencijalu, navedeni rezultati ukazuju da su neophodna dalja istraživanja kako bi se eksperimentalni uslovi rada na ovom uređaju optimizovali.

Predloženi koncept nivoa medijuma može se kombinovati sa različitim tipovima uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja što dovodi do širokog izbora potencijalnih eksperimentalnih uslova. Zbog toga odabir optimalne metode za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja može predstavljati izazov za istraživača, što nameće potrebu definisanja svojevrstnih stabala odluke (engl. *decision tree*) kako bi se izbor olakšao.



Slika 5. Šematski prikaz stabla odlučivanja pri razvoju metode za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata (prilagođeno iz Andreas i sar, 2018)

Andreas i sar. (2018) predstavili su OrBiTo stablo odluke koje je razvijeno sa ciljem da pomogne istraživačima u odabiru najprikladnije *in vitro* metode za ispitivanje brzine rastvaranja. OrBiTo stablo odluke (slika 5) sastoji se od četiri faze: (i) u prvoj fazi potrebno je definisati vrstu formulacije koja se ispituje (preparat sa trenutnim, produženim ili odloženim oslobađanjem); (ii) u drugoj fazi bira se vrsta uređaja (oficinalna/modifikovana/dinamički modeli) koja je poželjna, odnosno koja je dostupna; (iii) u okviru treće faze se razmatraju karakteristike lekovite supstance (rastvorljivost, kiselo-bazne osobine); (iv) u okviru četvrte faze definiše se detaljan eksperimentalni protokol. Eksperimentalni protokol sadrži kratak uvod, detaljan opis

eksperimentalnih uslova, kao i praktične informacije potrebne za izvođenje ispitivanja i odgovarajuće reference. Gde je moguće istaknuta su ograničenja za upotrebu određenog metoda. Stablo odlučivanja upućuje korisnike na različite nivoe složenosti sastava medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja (Andreas i sar, 2018).

Kiselo-bazne karakteristike lekovite supstance u fiziološkom opsegu pH vrednosti prepoznate su kao jedan od parametara koji može značajno uticati na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz preparata. Stoga su Tsume i sar (2014) predložili subklasifikaciju lekovitih supstanci BCS klase 2 i 4 na subklase a, b i c u zavisnosti od načina disocijacije u fiziološkom opsegu pH vrednosti ( $\text{pH} < 7,5$ ), gde bi se predložena subklasifikacija koristila kao polazna osnova za razvoj bioprediktivnih metoda za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz preparata. Autori ističu da se bioprediktivna metoda za ispitivanje brzine rastvaranja mora razvijati uz uključivanje najrelevantnijih varijabli, ali bez nepotrebnog usložnjavanja metoda. Adekvatan izbor metodologije može biti napravljen nakon procene svih važnih karakteristika lekovite supstance i formulacije, uključujući raspodelu veličine čestica, dozu, permeabilnost u različitim segmentima GI trakta, farmaceutski oblik, raspadljivost i td. U tabeli 1 dat je prikaz pristupa koji su predložili Tsume i saradnici (2014).

Kod lekovitih supstanci BCS klase 1 predloženo je izlaganje preparata fiziološki zasnovanom želudačnom soku (engl. *physiological gastric buffer*, PGB) odnosno 0,01 M HCl u zapremini od 250 ml, tokom 15 min, nakon čega se i preparat i korišćeni medijum prenose u 900 ml fiziološki zasnovanog crevnog soka (*physiological intestinal buffer*, PIB). Pod fiziološki zasnovanim crevnim sokom (PIB) podrazumeva se bikarbonatni pufer pH 6,5 sa koncentracijom u opsegu 5-15 mM ili neki drugi pufer sa sličnim puferskim kapacitetom. Iako lekovite supstance BCS klase 1 pokazuju visoku rastvorljivost i dobro se rastvaraju i u PGB i PIB medijumu, izlaganje preparata delovanju oba medijuma predloženo je kako bi se obuhvatio mogući uticaj pH vrednosti i korišćenog pufera na potencijalne fizičke promene lekovite supstance ili preparata kao što su prelazak iz soli u slobodnu kiselinu ili bazu, promena kristalnog oblika itd. Predloženo je ispitivanje u velikoj zapremini crevnog soka (900 ml) kako bi se simulirali *sink* uslovi, za koje se očekuje da postoje *in vivo* usled visoke permeabilnosti lekovite supstance. Upotreba velike zapremine medijuma kod ovih model supstanci treba da zameni prostor za apsorpciju (Tsume i sar, 2014).

Kod lekovitih supstanci BCS subklase 2a, predloženo je uključivanje prostora želuca, kao i prenošenje želudačnog sadržaja (uključujući rastvorenu i nerastvorenu lekovitu supstancu, kao i PGB) u prostor tankog creva na fiziološki relevantan način, kao što je kinetika prvog reda sa poluvremenom pražnjenja želuca od oko 15 min. U najvećem broju slučajeva korišćenje 900 ml PIB trebalo bi da adekvatno simulira *sink* uslove koji *in vivo* nastaju usled brze apsorpcije lekovite supstance. U slučajevima kada je Dozni broj (Do) visok, autori preporučuju izvođenje ispitivanja u fiziološki relevantnoj zapremini medijuma od 100 ml i uključivanje tzv. „prostora za apsorpciju“ čime bi se kreirali uslovi koji više odgovaraju fiziološkim. Prostor za apsorpciju se može uvesti u metodu za ispitivanje brzine rastvaranja ili upotrebom tzv. dvofaznog medijuma gde je jedna faza vodeni pufer u kome se lekovita supstanca rastvara, a druga organski rastvarač koji se ne meša sa vodom (npr. 1-oktanol) u koji rastvorena lekovita supstanca prelazi, ili korišćenjem Caco-2 ćelija i veštačkih membrana (Tsume i sar, 2014).

Za lekovite supstance BCS subklase 2b, predložena bioprediktivna metodologija podrazumeva korišćenje prostora želuca sa 250 ml PGB sa kontrolisanim pražnjenjem kinetikom prvog reda u 100 ml PIB uz uključivanje prostora za apsorpciju (naročito ukoliko je Dozni broj visok). Upotreba PGB i PIB, uključujući prenos odgovarajućom kinetikom posebno je značajna za lekovite supstance subklase 2b zbog njihove visoke rastvorljivosti u želudačnom sadržaju, praćeno niskom rastvorljivošću i potencijalnim taloženjem u tankom crevu (Tsume i sar, 2014).



Bioprediktivna metoda za lekovite supstance BCS subklase 2c podrazumeva upotrebu istih uređaja kao za subklasu 2a, uz primenu drugačijeg medijuma koji simulira crevni sadržaj. U ovom slučaju, preparat je potrebno izložiti kontaktu sa 250 ml PGB, a zatim prenos kinetikom prvog reda u 100 ml PIB koji sadrži fiziološki relevantnu koncentraciju fizioloških surfaktanata tj. žučnih kiselina i lipida. Fiziološke žučne kiseline i lipidi mogu poboljšati rastvorljivost nekih lekovitih supstanci subklase 2c, te je upotreba medijuma kao što je FaSSIF posebno relevantna za predviđanje *in vivo* ponašanja lekovitih supstanci subklase 2c (Tsume i sar, 2014).

Za lekovite supstance subklasa 2a, 2b i 2c BCS koje su na granici niske i visoke permeabilnosti, preporučuje se ispitivanje u skladu sa smernicama za subklase 4a, 4b i 4c.

Za razvoj bioprediktivne metode kod lekovitih supstanci BCS klase 3, predlaže se predtretman preparata sa 250 ml PGB tokom 15 min, sa naknadnim prebacivanjem i preparata i PGB u 100 ml PIB. Ukoliko je rastvorljivost lekovite supstance u crevnom soku takva da dolazi do smanjenja u brzini rastvaranja zbog odsustva *sink* uslova, preporučuje se korišćenje dvofaznog sistema. Ukoliko je neophodno uključiti odvojeni prostor za apsorpciju, preporučuje se upotreba Caco-2 ćelija ili veštačkih membrana. Posebna pažnja prilikom razvoja bioprediktivne metode za lekovite supstance BCS klase 3 mora se posvetiti razmatranju uticaja transportera i regionalnih razlika u permeabilnosti (Tsume i sar, 2014).

Kao i kod lekovitih supstanci BCS klase 3, usled niske permeabilnosti može doći do dostizanja koncentracije zasićenja lekovite supstance BCS klase 4 u crevnom soku usled nepostojanja *sink* uslova i niske rastvorljivosti. Stoga se za ispitivanje lekovitih supstanci BCS klase 4 (a, b i c) preporučuje primena 250 ml PGB u odvojenom prostoru sa kontrolisanim transferom u 100 ml PIB (za 4a i 4b), odnosno 100 ml PIB sa dodatkom žučnih kiselina i lipida (4c) sa zasebnim prostorom za apsorpciju (Tsume i sar, 2014).

Tabela 1. Pristup razvoju bioprediktivne metode za ispitivanje brzine rastvaranja (preuzeto iz Tsume i sar, 2014)

BCS subklasa	Fiziološki zasnovan želudačni sok	Uključiti prostor želuca?	Fiziološki zasnovan crevni sok	Uključiti prostor za apsorpciju? <sup>a</sup>
<b>1</b>	250 ml	Ne <sup>b</sup>	900 ml PIB <sup>c</sup>	Ne
<b>2a</b>	250 ml	Da <sup>d</sup>	100 ml PIB	Da
<b>2b</b>	250 ml	Da <sup>d</sup>	100 ml PIB	Da
<b>2c</b>	250 ml	Da <sup>d</sup>	100 ml PIB+žučne kis./lipidi	Da
<b>3</b>	250 ml	Ne <sup>b</sup>	100 ml PIB	Ne
<b>4a</b>	250 ml	Da <sup>d</sup>	100 ml PIB	Da
<b>4b</b>	250 ml	Da <sup>d</sup>	100 ml PIB	Da
<b>4c</b>	250 ml	Da <sup>d</sup>	100 ml PIB+žučne kis./lipidi	Da

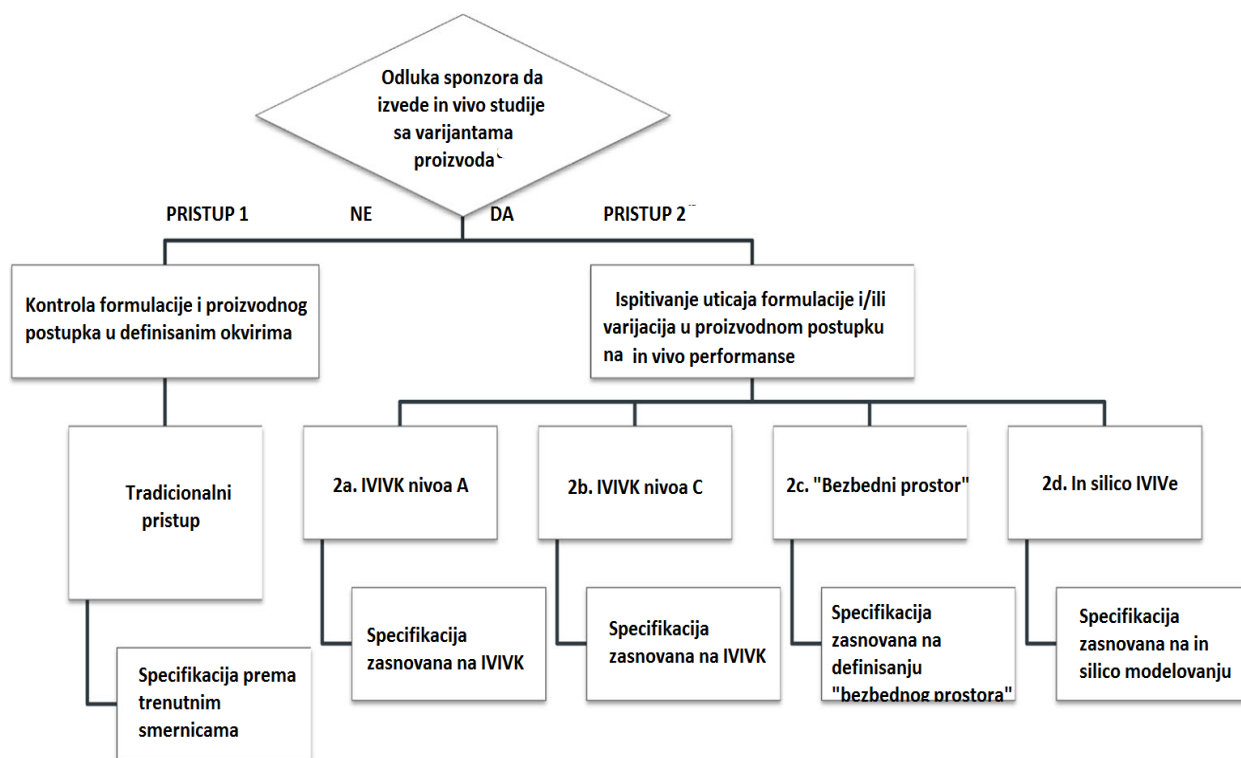
<sup>a</sup> Organski rastvarač (npr. 1 –oktanol) može se koristiti kao prostor za apsorpciju u slučaju supstanci kod kojih je  $\log D_{pH6,5} > 0,5-1$  (Mudie i sar, 2012). Alternativno, mogu se koristiti veštačke membrane ili Caco-2 dvosloj (Kataoka i sar, 2003, 2013)

<sup>b</sup> Prethodno tretirati preparat sa PGB u trajanju od 15 min i zatim preneti preparat i PGB u PIB.

<sup>d</sup> Pražnjenje prostora želuca kinetikom prvog reda brzinom  $2,8 h^{-1}$  (poluvreme pražnjenja 15 min)

### 1.3 Uspostavljanje klinički relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata

Značaj i pristup definisanju klinički relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja (engl. *clinically relevant dissolution specifications*, CRDS) predmet je intenzivnih razmatranja i diskusija usmerenih na uspostavljanje naučno zasnovanog okvira za njihovu buduću primenu (Abend i sar, 2018; Grady i sar, 2018; Heimbach i sar, 2019). U zavisnosti od karakteristika lekovite supstance, farmaceutskog oblika leka i postupka proizvodnje, s ciljem uspostavljanja klinički relevantnih specifikacija, najčešće je potrebno sprovesti dodatne *in vivo* studije koristeći varijante ispitivanog proizvoda u kojima su ciljano varirani neki od kritičnih svojstava materijala ili procesnih parametara koji dovode do promena u brzini rastvaranja lekovite supstance iz preparata *in vitro*. Hermans i saradnici (2017) definisali su dva pristupa razvoju CRDS. Šematski prikaz navedenih pristupa dat je na slici 6.



Slika 6. Stablo odluke za razvoj klinički relevantnih specifikacija za brzinu rastvaranja lekovite supstance iz preparata (preuzeto iz Hermans i sar, 2017)

**Pristup 2** podrazumeva izvođenje dodatnih *in vivo* studija u cilju boljeg razumevanja uticaja varijabilnosti formulacije i/ili proizvodnog postupka i uočenih razlika u brzini rastvaranja *in vitro* na farmakokinetički profil leka. Tokom izvođenja *in vivo* studija, varijante proizvoda biraju se tako da se finalno obezbede širi specifikacijski zahtevi za ispitivane faktore formulacije, odnosno parametre procesa proizvodnje. Kao što je prikazano na slici 6, ishod sprovedenih *in vivo* studija može odgovarati jednom od sledeća četiri scenarija: (i) *in vitro-in vivo* korelacija (IVIVK) nivoa A, (ii) IVIVK nivoa C, (iv) klinički utvrđen „bezbedni prostor“ i (v) uspostavljanje *in vitro-in vivo* ekstrapolacije (IVIVE) zasnovane na *in silico* modelovanju.

IVIVK nivoa A se može uspostaviti ako metoda za ispitivanje brzine rastvaranja *in vitro* adekvatno predviđa *in vivo* ponašanje leka. U ovom slučaju, izabrana metoda se može koristiti za definisanje kriterijuma prihvatljivosti na osnovu ciljnih vrednosti farmakokinetičkih parametara. IVIVK nivoa A može se koristiti za podnošenje zahteva za izostavljanje *in vivo* studija (engl.

*biowaiver*) ili kod *scale-up* i postregistracionih izmena. IVIVK nivoa C se uspostavlja kada je jedan ili više farmakokinetičkih parametara u korelaciji sa brzinom rastvaranja *in vitro* u jednoj ili više vremenskih tačaka. U ovom slučaju profil brzine rastvaranja *in vitro* se ne može koristiti za predviđanje celokupnog farmakokinetičkog profila leka. Klinički utvrđen „bezbedni prostor“ (engl. *safe space*) za brzinu rastvaranja *in vitro* može se definisati kada ispitivane varijante proizvoda pokazuju prihvatljive farmakokinetičke performanse, ali se među njima uočavaju razlike u brzini rastvaranja *in vitro*. IVIVE zasnovana na *in silico* modelovanju podrazumeva uspostavljanje veze između brzine rastvaranja *in vitro* i farmakokinetičkog odgovora upotrebom fiziološki zvananih farmakokinetičkih/biofarmaceutskih modela (engl. *physiologically based pharmacokinetic / biopharmaceutics modeling*, PBPK/PBBM), a model omogućava identifikaciju *in vitro* profila brzine rastvaranja koji će obezbediti željeni klinički učinak leka (Hermans i sar, 2017; McAllister i sar, 2019).

U literaturi postoje ograničeni primeri uspostavljanja IVIVK nivoa A u slučaju preparata sa trenutnim oslobađanjem koji sadrže lekovite supstance koje pripadaju BCS klasi 1/3 ili 4 s obzirom da kod ovih supstanci brzina rastvaranja nije ograničavajući korak za apsorpciju. Sa druge strane, uspostavljanje IVIVK nivoa C i klinički utvrđenog „bezbednog prostora“ se može očekivati za većinu lekovitih supstanci. Kod preparata sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance potrebno je poznavati celokupan profil koncentracije leka u plazmi, te se preporučuje upotreba IVIVK nivoa A.

Izvođenje kliničkih studija kako bi se ispitao klinički učinak različitih varijanti proizvoda i definisale klinički relevantne specifikacije za brzinu rastvaranja može predstavljati praktični izazov u nekim slučajevima, ili neopravdan iz etičkih aspekata. Primeri uključuju visokopotentne lekovite supstance koje se ne mogu davati zdravim ispitanicima, kao što su antitumorski lekovi. Pored toga, za neke lekove, kao što su lekovi za retke bolesti, ulaganje u izradu više varijanti proizvoda i izvođenje više studija biološke raspoloživosti kako bi se definisale klinički relevantne specifikacije nije praktično. U ovim situacijama biće potrebni alternativni pristupi da se osigura da će predložena metoda ispitivanja brzine rastvaranja i predložena specifikacija osigurati odgovarajući klinički učinak leka, a oni mogu, pre svega, biti zasnovani na *in silico* modelovanju i simulacijama (McAllister i sar, 2019)

McAllister i sar (2019) ističu da je prilikom definisanja klinički relevantnih specifikacija, neophodna integracija podataka o efikasnosti i bezbednosti leka, odnosno pomeranje od specifikacija koje obezbeđuju slične farmakokinetičke profile leka ka specifikacijama koje se zasnivaju na terapijskim ishodima. Skoriye inicijative predlažu uvođenje i primenu Plana aktivnosti za procenu biofarmaceutskog rizika (engl. *Biopharmaceutics Risk Assessment Roadmap*, BioRAM) kako bi se ovo obezbedilo (Selen i sar, 2014; Dickinson i sar, 2016; Selen i sar, 2020). BioRAM predstavlja „inovativnu strategiju za razvoj lekova usmerenu ka pacijentu, uz primenu integrisanog sistemskog pristupa zasnovanog na osnovnim biofarmaceutskim konceptima, uvidu u kliničku situaciju i definisanim terapijskim ciljevima“ (Cvijić i sar, 2020). U okviru BioRAM pristupa, gradi se razumevanje veza između karakteristika farmaceutskog oblika leka i ciljnog terapijskog ishoda. Konačni cilj je razvoj efikasnog i bezbednog leka dizajniranog u skladu sa potrebama i očekivanjima pacijenata (Selen i sar, 2014).

## **2. Integrirani biofarmaceutski pristup u razvoju i karakterizaciji lekova**

Integrirani biofarmaceutski pristup u razvoju i karakterizaciji lekova ima za cilj da ubrza razvoj efikasnih i bezbednih lekova u skladu sa potrebama i očekivanjima pacijenata. *In silico* modelovanje i simulacija prepoznato je kao jedan od značajnih alata u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova i našlo je široku primenu u oblasti farmacije. Među *in silico* modelima sve

širu primenu nalaze fiziološki zvanani farmakokinetički/biofarmaceutski modeli (PBPK/PBBM) što se ogleda u sve većem broju radova koje se bave ovom tematikom, a posebno veliki korak je implementacija ovog koncepta u regulatorna dokumenta.

## 2.1 Pojam i principi fiziološki zasnovanog farmakokinetičkog /biofarmaceutskog modelovanja

PBPK modeli predstavljaju univerzalno prihvaćen alat koji se u okviru biofarmaceutske karakterizacije lekova koristi za mehanističko tumačenje i predviđanje apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (ADME) lekovite supstance u organizmu (Reddy i sar, 2013). PBPK modeli se mogu proširiti da simuliraju farmakodinamiku lekova (PD) i u tom slučaju radi se o PBPK/PD modelima. Nedavno je uveden i pojam fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje (PBBM) kako bi se opisao pristup modelovanju koji je pre svega orjentisan ka uspostavljanju veze između bioprediktivnog *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i mehanističkog modelovanja apsorpcije leka (Bermejo, 2020).

Fiziološki zasnovano modelovanje ADME karakteristika leka zasniva se na tri seta ulaznih podataka: (i) biofarmaceutskim svojstvima (fizičko-hemijske i farmakokinetičke karakteristike) lekovite supstance, (ii) svojstvima formulacije i (iii) fiziološkim karakteristikama ciljne populacije/reprezentativnog pojedinca populacije. Ulazni podaci mogu biti preuzeti iz literature, eksperimentalno određeni i/ili *in silico* predviđeni. Modelovanje se vrši setom diferencijalnih jednačina koje opisuju vezu između unetih parametara (Grbić i sar, 2013). Jedan od izazova u razvoju PBPK/PBBM modela je dostupnost relevantnih podataka o fiziološkim parametrima populacije, naročito za posebne populacije kao što su pedijatrijska, gerijatrijska, trudnice i populacije sa određenom bolešću (Hartmanshenn i sar, 2016). Takođe, potreban je kritički pristup prilikom odabira relevantnih vrednosti parametara s obzirom da u literaturi može biti dostupan veliki broj različitih podataka.

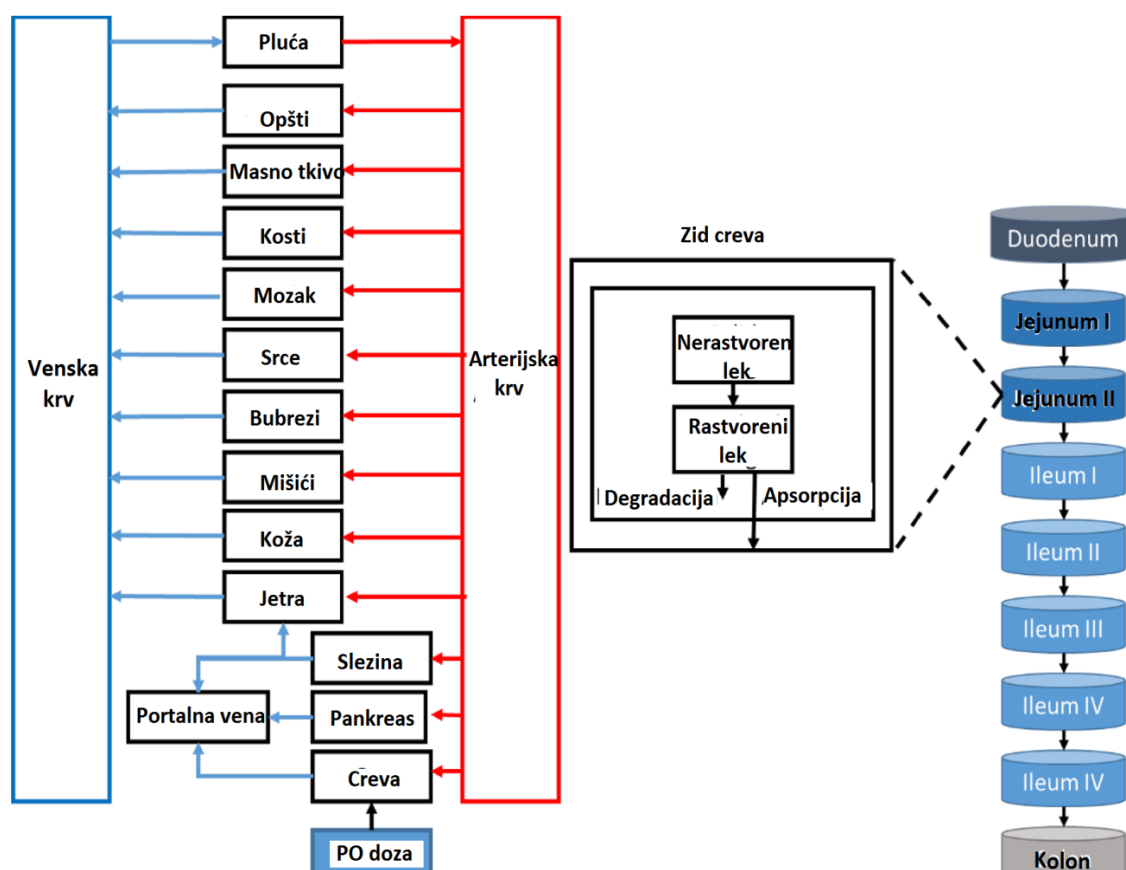
U literaturi se mogu naći primeri razvoja sopstvenih PBPK modela, ali je mnogo češća upotreba komercijalnih softverskih paketa, kao što su GastroPlus<sup>TM</sup>, Simcyp<sup>®</sup> i PK-Sim<sup>®</sup>. Komercijalni softverski paketi imaju unete baze podataka o relevantnim fiziološkim parametrima za različite populacije, te ne zahtevaju programerske veštine, odnosno predstavljaju tzv. „*user friendly*“ programe. Simulacije se mogu izvoditi za reprezentativnog pojedinca populacije ili čitavu populaciju kada se može simulirati i interindividualna varijabilnost (Jamei i sar, 2009; Kostewicz i sar, 2014).

Iako softverski paketi različitih proizvođača imaju određene specifičnosti, generalno svi obuhvataju prikaz relevantnih organa/tkiva povezanih sa sistemskom cirkulacijom. Slika 7 ilustruje primer modela integrisanog u softverski paket Simcyp<sup>®</sup> (Ji i sar, 2019).

Softverski paket Simcyp<sup>®</sup> (Simcyp Limited, Velika Britanija) zasnovan je na unapređenom modelu rastvaranja, apsorpcije i metabolizma (engl. *Advanced Dissolution Absorption and Metabolism*, ADAM). U okviru ovog modela GI trakt je podeljen na devet prostora (želudac, sedam prostora tankog creva, kolon) (slika 7), a lekovita supstanca se u svakom od njih može naći kao neoslobodena, nerastvorena, rastvorena i degradirana. Program omogućava praćenje supersaturacije i precipitacije, a lek može biti primenjen kao prezasićeni rastvor ili do supersaturacije može doći zbog promene u rastvorljivosti pri prelasku iz jednog u drugi prostor gastrointestinalnog trakta. Model daje mogućnost proučavanja različitih farmaceutskih oblika (tablete sa trenutnim oslobađanjem, tablete sa modifikovanim oslobađanjem i dr.) za koje se ili unose eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja ili se brzina rastvaranja predviđa Wang-Flanagan modelom, uzimajući u obzir sve relevantne faktore (zapremina intestinalne tečnosti, hidrodinamika, različita rastvorljivost u različitim segmentima gastrointestinalnog trakta). Efektivna permeabilnost se može predvideti na osnovu eksperimentalnih vrednosti

dobijenih ispitivanjem na kulturama ćelija ili veštačkim membranama (Caco-2, MDCK, LLC-PK1, PAMPA i dr.) ili na osnovu fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance (površina polarnog dela molekula i broja donora vodoničnih veza).

Ovaj model uzima u obzir populacione parametre i interindividualnu varijabilnost u pogledu fizioloških uslova na gladno i nakon primene obroka, kao i karakteristike specifične za vrstu, uzrast, rasu i oboljenja (Kostewicz i sar, 2014). ADAM model uzima u obzir varijabilnu brzinu pražnjenja želuca za različite farmaceutske oblike lekova, interindividualne razlike u vremenu prolaska kroz gastrointestinalni trakt, različite pH vrednosti gastrointestinalnih tečnosti u zavisnosti od uzrasta, populacije i unosa hrane, kao i varijabilnost zapremine i sastava fizioloških tečnosti. Informacije o različitim enzimima i regionalnoj distribuciji transportera u ćelijama epitela creva takođe su integrisane u Simcyp® model (Harwood i sar, 2012). Time je omogućeno simuliranje uticaja metabolizma i aktivnog transporta u enterocitima, ali i ispitivanje interakcija između lekova na ovom nivou (Neuhoff i sar, 2013). Osim toga, model daje mogućnost predviđanja efekata hrane na proces apsorpcije promenom navedenih fizioloških uslova. Simulacije je moguće sprovesti na populaciji zdravih dobrovoljaca gde referentnu osobu predstavlja dvadestepetogodišnji muškarac, težine 70 kg ili na nekoj drugoj ciljnoj populaciji (Jamei i sar, 2009).

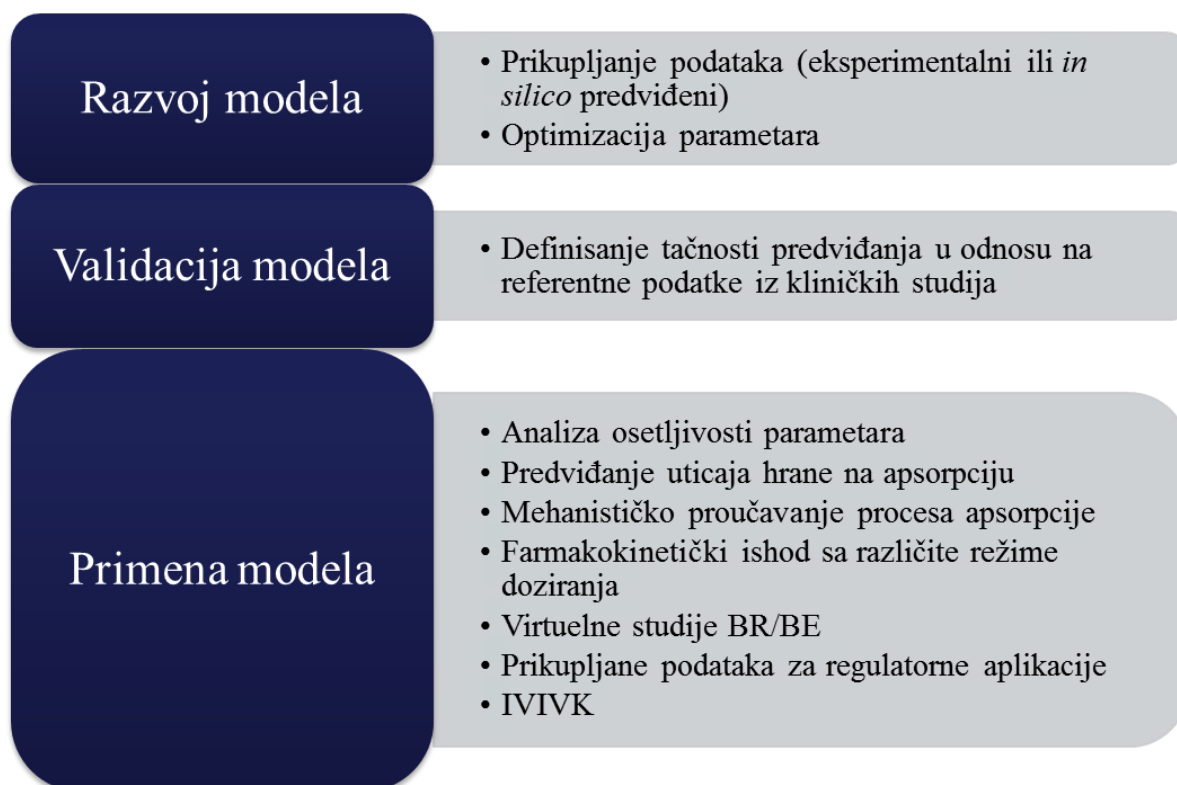


Slika 7. Šematski prikaz osnovnih elemenata PBPK (levo) i ADAM (desno) modela u okviru Simcyp® programskog paketa (preuzeto iz Ji i sar, 2019)

ADAM model je povezan sa farmakokinetičkim modelom jednostavnim prostornim (jedno-, dvo- ili troprostornim) modelom ili potpunim PBPK modelom u zavisnosti od toga koja se opcija odabere. Prostorni model je relativno jednostavan, ali zahteva prethodno poznavanje farmakokinetičkih parametara leka (klirens, volumen distribucije i dr.). Potpuni PBPK model opisuje raspodelu lekovite supstance u pojedinačnim tkivima/organima pri čemu raspodela za svako tkivo/organ može biti ograničena perfuzijom krvi u tkivo (engl. *perfusion limited*) ili

permeabilnošću supstance (engl. *permeability limited*) (Jones i Rowland-Yeo, 2013). Svako tkivo/organ je predstavljeno kao zasebna celina, opisana odgovarajućim setom parametara, a sva tkiva/organi su povezani sistemskom cirkulacijom.

Područje primene PBPK/PBBM modela je vrlo široko, ali pre primene neophodno je model razviti i validirati (slika 8) što u većini slučajeva predstavlja najduži korak. Modeli se razvijaju kao lek-specifični, a prethodno je neophodno prikupiti ulazne podatke, najbolje izvođenjem eksperimenata. Literaturne podatke je potrebno pažljivo evaluirati s obzirom da vrednosti pojedinih parametara mogu značajno varirati. Ukoliko neki od parametara nije eksperimentalno određen, može se predvideti *in silico*. Validacija modela predstavlja neizostavan korak kako bi se potvrdila prediktivna moć modela, ali ona je moguća samo u slučajevima kada su dostupni podaci iz kliničkih studija.



Slika 8. Tok postupka *in silico* modelovanja/simulacija

U literaturi su opisana tri pristupa PBPK/PBBM modelovanju, tzv. „*bottom-up*“, „*top-down*“ i „*middle-out*“ pristup. U ranim fazama razvoja leka, kada klinički podaci nisu dostupni, simulacije se mogu izvoditi isključivo na osnovu pretkliničkih i/ili *in silico* predviđenih vrednosti i takav pristup u literaturi se sreće pod nazivom „*bottom-up*“. Kod ovog pristupa mogu se očekivati neslaganja između predviđenih i podataka koji će se u kasnijim fazama dobiti u kliničkim studijama. Neslaganja prvenstveno potiču od nepouzdanosti ulaznih parametara koji se koriste za simulaciju. U slučaju kada se podaci iz kliničkih studija koriste kao ulazni podaci govorimo o „*top-down*“ pristupu i odnosi se na situacije kada se vrednosti parametara modela optimizuju kako bi se postiglo bolje slaganje sa podacima iz farmakokinetičkih studija. Za dodatni razvoj i validaciju modela može se koristiti i kombinovani tzv. „*middle-out*“ pristup koji predstavlja kombinaciju prethodna dva pristupa.

## 2.2 Primena u razvoju, proizvodnji i regulativi lekova

Veliki broj objavljenih radova ukazuju na sve veći značaj modelovanja/simulacija u razvoju farmaceutskih preparata. Iako se najveći broj studija odnosi na oralni put primene leka, sve je više primera u literaturi u kojima se istraživanja odnose i na druge puteve primene (okularni, pulmonalni, dermalni i dr.). PBPK/PBBM modelovanje nalazi primenu u različitim fazama razvoja leka, počev od definisanja strategije za izbor formulacije, preko izbora optimalne formulacije, definisanja kritičnih karakteristika kvaliteta, klinički relevantnih specifikacija, uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije, kao podrška zahtevu za *biowaiver* i td (Jamei i sar, 2020; Lin i sar, 2022; Mille i sar, 2019; Mitra i sar, 2021)

PBPK/PBBM modelovanje je uspešno korišćeno u ispitivanju uticaja lekova koji povećavaju pH vrednost želudačnog sadržaja (antagonisti H<sub>2</sub> receptora, inhibitori protonske pumpe i antacidi) na apsorpciju lekovitih supstanci tipa slabih baza. Naime, u literaturi se mogu sresti brojni primeri lek-lek interakcija povezanih sa pH vrednošću gde je zabeleženo smanjenje biološke raspoloživosti lekovite supstance čak i do 10 puta, usled povišene pH vrednosti želudačnog sadržaja (Mitra i sar, 2021). S obzirom na veliki klinički značaj ovih interakcija, ulažu se brojni naponi kako bi se one bolje razumele i izbegle (Dodd i sar, 2019; Mitra i Kesisoglou, 2013). U literaturi se čak mogu pronaći preporuke kako proceniti ovaj vid interakcija u fazi razvoja lekova, mada zvanične smernice ne postoje (Mitra i sar, 2021).

Kesisoglou i sar (2018) istakli su značaj korišćenja rezultata *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja kao ulaznih parametara za PBPK/PBBM modelovanje. U tom pogledu, veoma su značajni naponi da se razviju bioprediktivne metode ispitivanja brzine rastvaranja koje bi adekvatno simulirale ove interakcije *in vitro* (Litou i sar, 2016; Segregur i sar, 2019). Parrott i sar (2016) ispitivali su uticaj esomeprazola na apsorpciju alacetiniba pomoću PBBM modelovanja. Rezultati simulacija doprineli su definisanju preporuka za istovremenu primenu alectiniba sa lekovima koji utiču na pH vrednost želudačnog sadržaja.

Paraiso i sar. (2020) ispitivali su mogućnost razvoja PBPK modela i definisanja klinički relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja zolpidema, sedativa koji se koristi u terapiji poremećaja spavanja. Naime, za lekove koji se koriste u terapiji poremećaja spavanja, vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi je vrlo značajan parametar kako bi se postiglo brzo delovanje, o čemu se mora posebno voditi računa prilikom zamene lekova u terapiji. Isti autori razmatrali su i uticaj hrane na oslobađanje i apsorpciju zolpidema s ciljem definisanja „bezbednog prostora“ za brzinu rastvaranja lekovite supstance iz tableta. PBPK/PBBM model razvijen je korišćenjem komercijalnog Simcyp<sup>®</sup> softverskog paketa i seta farmakokinetičkih i farmakodinamičkih podataka i rezultata *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja. Model je korišćen za identifikaciju klinički relevantnih specifikacija za *in vitro* brzinu rastvaranja. Simulacije su omogućile definisanje klinički relevantnih specifikacija za brzinu rastvaranja i pokazano je da ako se 85% lekovite supstance rastvori tokom 45 min, očekuje se minimalan uticaj na farmakokinetički profil leka. Rezultati dobijeni PBPK simulacijama ukazuju da je regulatorni zahtev >85% rastvorene lekovite supstance nakon 30 min isuviše restriktivan. Takođe se došlo do zaključka da je preporučljivo izbegavati uzimanje zolpidem tableta uz i odmah nakon obroka, što je i navedeno u uputstvu za lek Stilnox<sup>®</sup>.

Jedna od opcija PBPK/PBBM modela je analiza osetljivosti parametara (engl. *parameter sensitivity analysis*, PSA) koja nalazi veliku primenu kako bi se procenio uticaj određenih parametara (npr. veličine čestica, rastvorljivosti itd.) na izlazni parametar od interesa (npr. koncentracija leka u plazmi, frakcija apsorbovanog leka, vreme postizanja maksimalne koncentracije leka u plazmi i dr.). Analiza osetljivosti parametara omogućava identifikaciju kritičnih parametara koji utiču na obim i brzinu apsorpcije oralno primenjenih lekova. Analiza

osetljivosti parametara se može koristiti za razumevanje mogućih razloga niske biološke raspoloživosti lekova, kao i velike varijabilnosti među populacijom (Mitra i sar, 2021).

Mathias i Crison (2012) prikazali su slučaj gde je PBPK modelovanje, kao i opcija analize osetljivosti parametara, uspešno korišćeno u ranim fazama razvoja formulacije kako bi se umanjio uticaj pH vrednosti na rastvaranje i apsorpciju lekovite supstance. Korišćena je model supstanca tipa slabe baze sa pH-zavisnom rastvorljivošću u fiziološkom opsegu pH vrednosti, što ukazuje da kod pacijenata kod kojih je pH vrednost želudačnog sadržaja izmenjena (pacijenti sa ahloridijom ili pacijenti koji uzimaju antacide, H<sub>2</sub>-blokatore ili inhibitore protonске pumpe) može doći do smanjene apsorpcije leka zbog precipitacije do koje može doći zbog povišenih vrednosti pH u želucu. Stoga je razvijen lek-specifičan model korišćenjem GastroPlus<sup>TM</sup> softverskog paketa, i sprovedena analiza osetljivosti parametara za dva izabrana ulazna parametra (pH vrednost u želucu i veličina čestica lekovite supstance). Simulacije su pokazale da, ukoliko se veličina čestica održava ispod određene vrednosti (u ovom slučaju 100 µm), pH vrednost želudačnog sadržaja neće uticati na profil brzine rastvaranja i apsorpcije. Ovaj primer je pokazao da relativno jednostavna strategija u formulaciji može omogućiti prevazilaženje problema niske biološke raspoloživosti lekovite supstance kod određenih pacijenata. Pored toga, *in silico* dobijeni podaci korišćeni su da se opravda postavljeno ograničenje za veličinu čestica pred regulatornim organima. U literaturi se mogu pronaći brojni drugi primeri korišćenja *in silico* modelovanja i analize osetljivosti parametara za definisanje specifikacija za veličinu čestica lekovite supstance (Parrott i sar, 2014; Pepin i sar, 2016; Li i sar, 2019).

Stillhart i sar. (2019) prikazali su zanimljiv slučaj gde je PBPK modelovanje korišćeno kako bi se usmerio razvoj formulacije za pedijatrijsku populaciju i kako bi se ubrzao početak izvođenja *in vivo* studije na pedijatrijskim pacijentima. Radi se o razvoju oralnog rastvora za pedijatrijsku populaciju sa lekovitom supstancom tipa slabe baze koja pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost u fiziološkom opsegu pH vrednosti i visoku permeabilnost. U prvoj fazi, razvijen je PBBM model za odrasle koristeći farmakokinetičke podatke iz faze 1 kliničkog ispitivanja. Model je predvideo brzu i potpunu apsorpciju lekovite supstance kod odraslih bez precipitacije po prelasku u tanko crevo. Potom je model skaliran da bi se koristio kod pedijatrijske populacije. Analiza osetljivosti parametara je pokazala da u pedijatrijskoj populaciji permeabilnost, pH vrednost u želucu i tankom crevu i konstanta precipitacije nemaju značajnog uticaja na biološku raspoloživost lekovite supstance. Takođe je pokazano da se izvestan stepen precipitacije može očekivati jedino u slučaju snižene koncentracije žučnih soli u intestinumu. Na osnovu PBBM modelovanja zaključeno je da se formulacija slično ponaša kod pedijatrijske populacije kao i kod odraslih osoba što je ubrzalo otpočinjanje kliničkog ispitivanja u pedijatrijskoj populaciji. Dobra predviđanja pedijatrijskog modela su kasnije potvrđena farmakokinetičkim podacima dobijenim u farmakokinetičkoj studiji na 33 novorođenčadi.

Pokazano je da uzimanje hrane utiče na farmakokinetiku čak 40% oralnih preparata registrovanih u poslednjih 10 godina (Pepin i sar, 2021), te je itekako značajno predvideti i okarakterisati ovaj uticaj. Iako trenutno važeće regulatorne smernice prihvataju samo rezultate kliničkih studija u dokazivanju uticaja hrane na farmakokinetiku leka, u literaturi se mogu pronaći brojni primeri procene ovog uticaja korišćenjem PBPK/PBBM. Neki od njih sumirani su u radovima Kesisoglou (2020) i Cheng i Wong (2020). Pepin i saradnici (2021) su dali detaljan prikaz „*middle-out*“ pristupa modelovanju kako bi predviđali uticaj hrane kod više različitih model supstanci. Bilo je neophodno kombinovanje „*bottom-up*“ pristupa uz izvesnu optimizaciju ključnih parametara kako bi se postiglo adekvatno predviđanje uticaja hrane na izabrane model supstance (furosemid, nefazodon i aprepitant). Kod furosemida je, na primer, bilo neophodno definisati apsorpcioni prozor, dok je kod aprepitanta sprovedeno ispitivanje brzine rastvaranja u biorelevantnom medijumu i dobijeni profili su korišćeni kao ulazni parametri, kako bi se dobila adekvatna predviđanja. Jereb i saradnici (2019) ispitivali su uticaj hrane na biološku ekvivalenciju dve formulacije koje sadrže različite forme lekovite supstance (amorfna i kristalna)



koja pripada BCS klasi 2. Razvijeni PBPK model pokazao se uspješnim u predviđanju uticaja hrane na različite kristalne forme ispitivane model supstance.

PBPK/PBBM modelovanje se takođe može koristiti za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije/veze tako da se *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja može koristiti za procenu uticaja faktora koji će uticati na biološku raspoloživost i definisanje klinički relevantnih specifikacija, kao i prilikom obrazloženja predloga za „*biowaiver*“ (Bermejo i sar, 2020; Wu i sar, 2021; Yuvaneshwari i sar, 2022).

PBPK/PBBM modelovanje može se sprovoditi na reprezentativnom pojedincu populacije, ali vrlo često je značajno simulacije izvoditi na grupi virtuelnih subjekata kako bi se predvidela interindividualna varijabilnost. García i sar (2021a) pokušali su da visoku varijabilnost  $C_{max}$  i PIK za tablete sa trenutnim oslobađanjem aciklovira objasne simulacijama na virtuelnim subjektima. PBBM je pokazalo da je aciklovir supstrat organskog katjonskog transportera, te da je njegov izražen polimorfizam odgovoran za varijabilnu farmakokinetiku aciklovira. Dodatno, PBBM modelovanje je pokazalo da ovaj uticaj prevazilazi uticaj brzine rastvaranja, te da u ovom slučaju veoma brzo rastvaranje nije neophodno za BCS zasnovan „*biowaiver*“. Brojne studije ukazuju na značaj ovog pristupa pri razvoju lekova i definisanju preporuka za doziranje za određene populacije pacijenata, kao što su pedijatrijska populacija (Gerhart i sar, 2021; Wang i sar, 2021), gerijatrijska populacija (Chetty i sar, 2018; Rashid i sar, 2021) ili populaciju pacijenata sa određenom bolešću (Heimbach i sar, 2020).

Radova u kojima je ispitivana uspešnost PBPK/PBBM modelovanja u razvoju formulacija za ostale puteve primene lekova još uvek je malo i novijeg su datuma. Ladumor i Unadkat (2022) koristili su PBPK modelovanje kako bi predvideli regionalnu raspodelu u plućima i sistemsku bioraspoloživost nakon inhalacione primene morfina i nikotina. Koristili su opciju analize osetljivosti parametara kako bi ispitali uticaj relevantnih parametara na obim i raspodelu ispitivanih lekovitih supstanci u plućima, njihovu apsorpciju i koncentraciju u plazmi. Model se pokazao uspješnim u predviđanju raspodele lekovitih supstanci u plućima i njihove koncentracije u plazmi, te je zaključeno da se PBPK modelovanje može uspešno koristiti u razvoju inhalacionih preparata. U studiji Le Merdy i saradnika (2019) opisana je upotreba okularnog modela u mehanističkoj interpretaciji interakcije između karakteristika formulacije (veličina čestica i viskozitet) i fizioloških faktora na lokalnu raspoloživost kapi za oči tipa suspenzije. U drugoj studiji, Le Merdy i saradnici (2022) koristili su okularni model u okviru GastroPlus<sup>TM</sup> softverskog paketa kako bi izvršili ekstrapolaciju rezultata dobijenih na zečevima za kapi za oči sa moksifloksacinom na ljude. Model se pokazao uspješnim u predviđanju koncentracije leka u kornei i očnoj vodici na osnovu rezultata dobijenih na zečevima. Model usne duplje korišćen je u brojnim studijama kako bi se predvidela biološka raspoloživost iz različitih doziranih oblika za primenu u usnoj duplji kao što su oralno-disperzibilni filmovi (Chen i sar, 2020), sublingvalne tablete (Xia i sar, 2015; Santos, 2021) i dr.

Veliki korak koji je uticao na širu primenu PBPK/PBBM modelovanja je implementacija ovog koncepta u regulatorna dokumenta i smernice. Vodeći regulatorni organi prepoznali su značaj PBPK/PBBM modelovanja i tokom prethodnih nekoliko godina uložili su velike napore da pripreme relevantne vodiče. Nedavno izdati vodiči na ovu temu uključuju:

- ✓ *Guideline on the reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation*, publikovan od strane Evropske agencije za lekove u decembru 2018. godine (stupio na snagu u julu 2019. godine);
- ✓ *Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses Format and Content Guidance for Industry*, publikovan od strane Američke agencije za hranu i lekove u septembru 2018. godine;

- ✓ *The Use of Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses-Biopharmaceutics Applications for Oral Drug Product*, draft verzija objavljena od strane Američke agencije za hranu i lekove u oktobru 2020. godine;
- ✓ *ICH Guideline E11A on pediatric extrapolation*, draft verzija objavljena od strane Evropske agencije za lekove u aprilu 2022. godine;
- ✓ *ICH Guideline M12 on drug interaction studies*, draft verzija objavljena od strane Evropske agencije za lekove u julu 2022. godine.

Iako regulatorni organi podržavaju upotrebu PBPK/PBBM modelovanja, broj odobrenja regulatornih organa koja su delimično ili potpuno zasnovana na *in silico* generisanim podacima i dalje je prilično ograničen (EMA, 2016; Luzon i sar, 2017; Grimstein i sar, 2019; Wang, 2019). Većina zahteva odnosi se na upotrebu PBPK/PBBM modelovanja za predviđanje lek-lek interakcija, a značajno manje za predviđanje apsorpcije i biološke raspoloživosti u posebnim populacijama (pedijatrijska, trudnice i td.), za procenu uticaja hrane, mehanističko proučavanje uticaja enzima i transportera na biološku raspoloživost, za individualizaciju terapije i slično (Mitra i sar, 2021).

### 2.3 Kritički pristup razvoju, validaciji i primeni PBPK/PBBM modela

Tokom prethodnih nekoliko decenija PBPK/PBBM modelovanje unapređeno je u vrlo korisnu alatku u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova i našlo je svoje mesto u različitim fazama razvoja lekova. Komercijalizovano je nekoliko softverskih paketa koji predstavljaju „*user-friendly*“ opciju PBPK/PBBM modelovanja. Veliki broj publikacija u vodećim međunarodnim časopisima, kao i određeni broj regulatornih odobrenja govore u prilog činjenici da, kada se pravilno koristi, PBPK/PBBM modelovanje može značajno unaprediti razvoj farmaceutskih preparata. Sugano (2021) ipak ističe da moramo biti izuzetno oprezni kako se „*ne bismo izgubili u modelovanju i simulaciji*“.

Naime, nedavne sistematske evaluacione studije slučajeva ukazuju na nisku prediktivnu moć „*bottom-up*“ pristupa, što je posledica još uvek nedovoljnog poznavanja fiziologije čoveka (Sjörgeen i sar, 2016; 2017; Darwich i sar, 2017; Matsumura i sar, 2020; Ahmad i sar, 2020). Ovo je naročito izraženo za određene populacije, kao što su pedijatrijska ili gerijatrijska, kao i populaciju pacijenata sa određenom bolešću, s obzirom da još uvek nisu poznate vrednosti svih parametara koji prate određena patološka stanja. Iz toga proizilazi da se u gotovo svim studijama slučaja koristi optimizacija parametara kako bi se simulirana kriva koncentracije leka u plazmi što bolje poklapala sa kliničkim podacima. Nakon simulacije, kriva koncentracije leka u plazmi se gotovo savršeno se poklapa sa *in vivo* podacima. Međutim, ovo savršeno poklapanje ne potvrđuje validnost svih korišćenih parametara i jednačina modela. Naime, optimizacija jednog parametra, naročito ukoliko se ne definiše odgovarajuće obrazloženje za optimizovanu vrednost, može sakriti greške drugih parametara. Zato je optimizaciju neophodno izvoditi vrlo obazrivo, a optimizovani model je neophodno validirati na osnovu seta kliničkih farmakokinetičkih podataka koji nije korišćen za optimizaciju modela.

Sa druge strane, vrednosti fizioloških parametara dostupne u literaturi pokazuju velike varijacije (pH vrednost želudačnog i crevnog sadržaja, koncentracija žučnih soli, puferski kapacitet i dr). Osim toga, istraživač se može naći u dilemi koju od dostupnih literaturnih vrednosti za određeni parametar je optimalno koristiti. Naime, danas je dostupan veliki broj različitih metoda za određivanje permabilnosti, *in vitro* brzine rastvaranja, rastvorljivosti itd. te je potreban kritički pristup u izboru klinički relevantnih vrednosti parametara. U budućnosti potrebno je usaglasiti fiziološke parametre i diferencijalne jednačine različitih modela kako bi

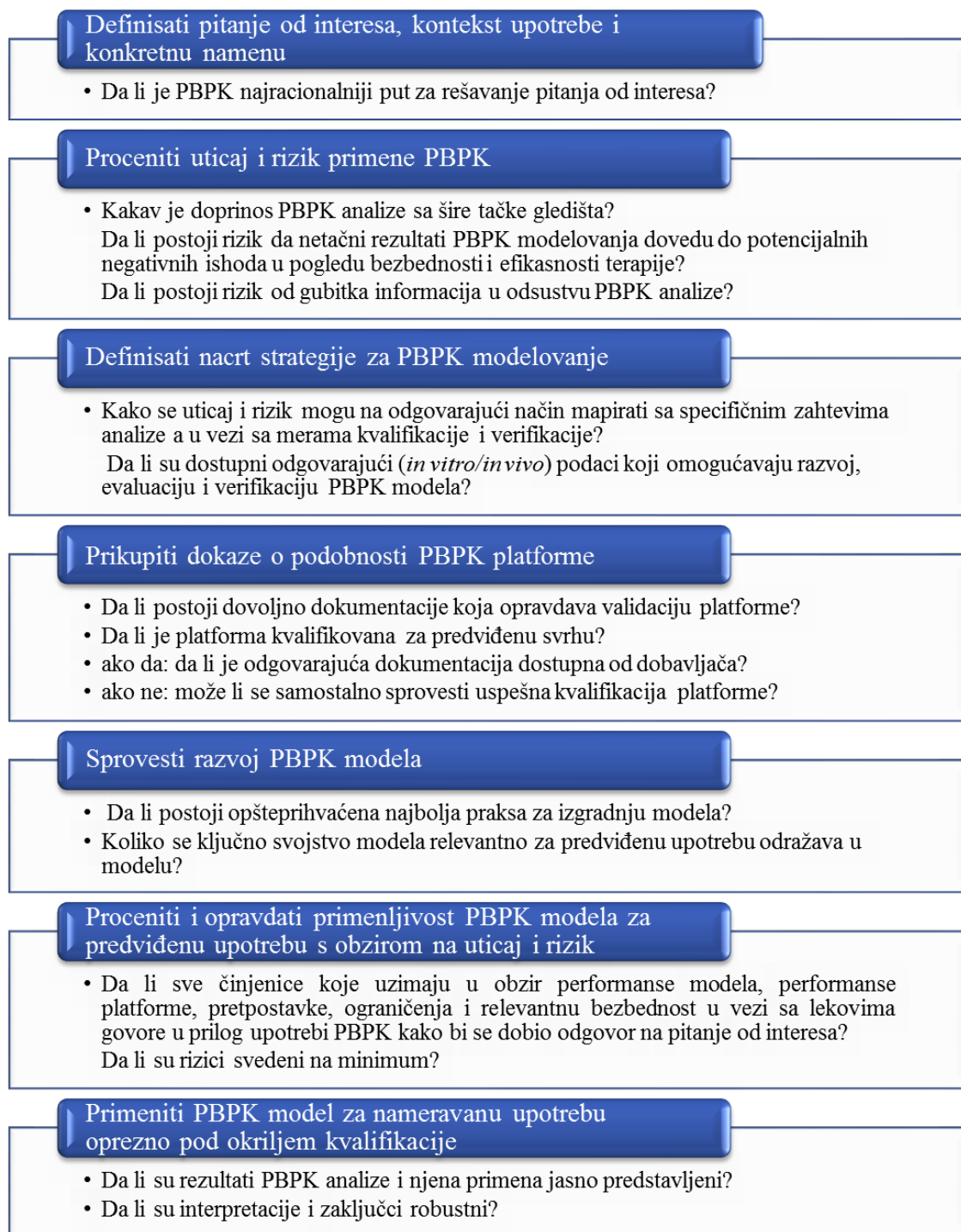
rezultati simulacija bili uporedivi. Pored toga, potrebno je koristiti standardizovane metode za određivanje fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih parametara vezanih za lekovitu supstancu (Ono i sar, 2019).

„*Middle-out*“ pristup podrazumeva da su neki parametri PBPK modela dobijeni u *in vitro* ispitivanjima, dok se drugi izračunavaju iz kliničkih podataka. Navedeni pristup u literaturi se često sreće i kao „*local middle-out*“ pristup i prilikom izveštavanja veoma je važno da se navede u odeljku o metodama. Brojne studije ističu da neadekvatna upotreba „*local middle-out*“ pristupa može smanjiti kredibilitet PBPK modelovanja (Li i sar, 2018; Peters i Dolgos, 2019). „*Local middle-out*“ potreban je kada „*bottom-up*“ predviđanje nije zadovoljavajuće za predviđenu namenu. Široko rasprostranjena upotreba ovog pristupa govori u prilog rezultatima sistemskih evaluacija koje ukazuju da trenutni PBPK modeli zahtevaju dodatna poboljšanja. Neslaganja između predviđanja „*bottom-up*“ metodom i kliničkih podataka treba pažljivo analizirati s obzirom da se iz toga mogu izvesti zaključci kako poboljšati jednačine i parametre modela. „*Global middle-out*“ pristup koristi se kada neki fiziološki parametar nije dostupan u literaturi, gde se on procenjuje na osnovu podataka iz više farmakokinetičkih studija i za više različitih lekovitih supstanci.

Veoma bitan aspekt *in silico* modelovanja je adekvatno izveštavanje. Transparentnost i ponovljivost moraju biti obavezni elementi izveštaja u oblasti PBPK modelovanja kako bi se obezbedio njegov kredibilitet (EMA, 2018; Shebley i sar, 2018). Očekuje se da autori moraju pisati radove što je moguće transparentnije kako bi omogućili uvid recenzentima i osigurali ponovljivost nezavisnih trećih strana. U uvodnom delu potrebno je detaljno objasniti svrhu PBPK modelovanja. Treba definisati pitanje od interesa i kontekst upotrebe PBPK modelovanja (Kuemmel i sar, 2020). Nijedan model nije univerzalan i treba izabrati matematički model koji odgovara određenoj nameni. Trebalo bi obrazložiti odabir PBPK modela. PBPK model treba izabrati s obzirom na svrhu modelovanja, ali i dostupne podatke u svakoj fazi razvoja leka. U ranim fazama razvoja leka, jednostavan PBPK model može biti dovoljan. U kasnijim fazama razvoja leka i nekon dobijanja dozvole za lek, složeniji PBPK model može biti potreban za istraživanje kompleksnijih kliničkih situacija.

Jednačine primenjenog modela, fiziološki parametri i karakteristike lekovite supstance moraju biti eksplicitno navedeni ili moraju biti date odgovarajuće reference na njih, kako bi se omogućila odgovarajuća recenzija i ponovljivost. Eksperimentalni deo treba da bude napisan što je moguće detaljnije kako bi se omogućila reprodukcija modelovanja. Ova tačka je kritična za osiguranje kredibiliteta istraživanja. Ako deo modela nije otkriven, taj deo postaje tzv. „crna kutija“. Pošto crna kutija može da maskira greške u bilo kom delu modela, kredibilitet celokupnog istraživanja može biti narušen postojanjem samo jednog neotkrivenog dela (Sugano, 2021). Konačno i najvažnije, da bi se obezbedio razvoj pouzdanih modela, neophodan je multidisciplinarni pristup eksperata iz različitih oblasti uključujući biofarmaciju, farmakokinetiku, statistiku, biohemiju, molekularnu biologiju, genetiku i td. (Sugano, 2021).

Danas se velika pažnja posvećuje temi obezbeđenja kvaliteta i definisanja „dobrih praksi“ koje treba usvojiti kako bi se smanjila „nesigurnost“ u PBPK/PBBM modelovanju. Frechen i Rostami-Hodjegan (2022) dali su primer ključnih koraka i pitanja koja treba slediti tokom razvoja modela u cilju obezbeđivanja kvaliteta u PBPK modelovanju (slika 9). Ovi autori ističu da je, pre svega, važno jasno definisati ciljeve *in silico* modelovanja, potom strategiju razvoja PBPK/PBBM modela, prikupiti dokaze o kvalifikaciji platforme za planiranu namenu, definisati metode provere validnosti modela i način implementacije rezultata. Takođe je neophodno definisati dužnosti i odgovornosti svakog od članova tima, način čuvanja generisanih modela i dobijenih rezultata kao i način izveštavanja. Globalna harmonizacija protokola za evaluaciju PBPK modela i uspostavljanje dobrih praksi u modelovanju i simulaciji doprineli bi široj upotrebi PBPK/PBBM modelovanja u regulatorne svrhe.



Slika 9. Šematski prikaz ključnih koraka za obezbeđivanje kvaliteta PBPK modelovanja (prema Frechen i Rostami-Hodjegan, 2022)

## 2.4 Biofarmaceutska klasifikacija lekova

Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova (BCS) zasnovan je na mehanističkoj pretpostavci da brzina i obim apsorpcije oralno primenjenih lekova zavise od rastvorljivosti i permeabilnosti lekovite supstance u gastrointestinalnom traktu. Prema BCS, lekovite supstance su na osnovu rastvorljivosti i permeabilnosti klasifikovane u četiri klase. BCS je opšte prihvaćen sistem klasifikacije lekova koji nalazi veliku primenu u svim razvojnim fazama lekova, kao i u njihovoj regulatornoj proceni.

Prema ICH smernici M9 (EMA, 2020), podnošenje zahteva za izostavljanje *in vivo* ispitivanja bioekvivalentnosti (engl. *biowaiver*) zasnovano na BCS konceptu, ograničeno je na visoko rastvorljive supstance (BCS klasa 1 i 3), sa poznatom apsorpcijom i velikom terapijskom širinom. Prema ICH smernicama, visoko rastvorljivim smatraju se one lekovite supstance kod kojih se najveća pojedinačna terapijska doza potpuno rastvara u 250 ml ili manje vodenog medijuma u opsegu pH vrednosti 1,2 - 6,8 ( $Do < 1$ ). Permeabilnost se definiše na osnovu stepena apsorpcije lekovite supstance ( $F_a$ ). U okviru ove smernice, prepoznata je i kategorija supstanci koje pokazuju umerenu permeabilnost, te su lekovite supstance klasifikovane na one koje pokazuju: (i) visoku permeabilnost ( $F_a \geq 0,85$ ); (ii) umerenu permeabilnost ( $0,50 < F_a < 0,85$ ); (iii) nisku permeabilnost ( $F_a < 0,50$ ).

Ovaj koncept je primenljiv na preparate sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance za oralnu primenu i sa sistemskim dejstvom. Da bi se odobrilo izostavljanje *in vivo* studija bioekvivalentnosti, moraju biti ispunjeni sledeći preduslovi:

- lekovita supstanca pokazuje visoku rastvorljivost i visoku permeabilnost (BCS klasa 1);
- referentni i test preparat pokazuju veoma brzo rastvaranje (>85% deklarisanog sadržaja se rastvara za 15 minuta) ili brzo rastvaranje aktivne supstance (85 % deklarisanog sadržaja se rastvara za 30 minuta), na sve tri relevantne pH vrednosti u okviru fiziološkog raspona pH (1,2; 4,5 i 6,8) uz pokazanu sličnost profila brzine rastvaranja;
- pomoćne supstance koje mogu uticati na biorasploživost su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične i u referentnom i u test preparatu.

Ili da:

- lekovita supstanca pokazuje visoku rastvorljivost i nisku permeabilnost (BCS klasa 3);
- referentni i test preparat pokazuju veoma brzo rastvaranje (>85% deklarisanog sadržaja se rastvara za 15 minuta) na sve tri relevantne pH vrednosti, pri čemu se profili brzine rastvaranja smatraju sličnim bez statističke obrade;
- pomoćne supstance koje mogu uticati na biorasploživost su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične i u referentnom i u test preparatu.

Kriterijumi za klasifikaciju lekovite supstance kao visoko/nisku permeabilne i visoko/nisko rastvorljive u okviru BCS su okarakterisani kao konzervativni od strane velikog broja eksperata i predloženo je nekoliko modifikovanih sistema za klasifikaciju sa ciljem prevazilaženja uočenih ograničenja (Butler i Dressman, 2010; Macheras i Karalis, 2014; 2018; Varma i sar, 2015; Wu i Benet, 2005).

Wu i Benet (2005) su prepoznali da većina lekovitih supstanci visoke permeabilnosti podleže intenzivnom metabolizmu, dok se većina lekovitih supstanci niske permeabilnosti elimiše putem bubrega u nepomenjenom obliku. Zato su predložili Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova na osnovu dispozicije (engl. *Biopharmaceutics drug disposition classification system*, BDDCS) gde se kao jedan od kriterijuma za klasifikaciju koristi obim metabolizma (slika 10). S obzirom da vrednost permeabilnosti određena *in vitro/in vivo* nije uvek u direktnoj korelaciji sa obimom apsorpcije, BDDCS je privukao veliko interesovanje naučnika. BDDCS nalazi veliku primenu u predviđanju uticaja transportera na dispoziciju lekova, kao i predviđanju lek-lek interakcija (Charalabidis i sar, 2019; Bocci i sar, 2022). Bitno je napomenuti da su EMA i FDA prihvatile obim metabolizma kao alternativni kriterijum za procenu obima apsorpcije (FDA, 2017; EMA, 2020).

<b><u>Klasa 1</u></b>	<b><u>Klasa 2</u></b>
<b>Visoka rastvorljivost</b>	<b>Niska rastvorljivost</b>
<b>Obiman metabolizam (<math>\geq 70\%</math> (90%))</b>	<b>Obiman metabolizam (<math>\geq 70\%</math> (90%))</b>
<b>(efekat transportera je zanemarljiv)</b>	<b>(dominantan uticaj efluks transportera)</b>
Metabolizam je dominantan put eliminacije leka	
<b><u>Klasa 3</u></b>	<b><u>Klasa 4</u></b>
<b>Visoka rastvorljivost</b>	<b>Niska rastvorljivost</b>
<b>Nizak obim metabolizma</b>	<b>Nizak obim metabolizma</b>
<b>(dominantan uticaj influks transportera)</b>	<b>(dominantan uticaj influks i efluks transportera)</b>
Najveći deo leka se izlučuje u nepromenjenom obliku	

Slika 10. BDDCS sistem klasifikacije lekova (prilagođeno iz Wu i Benet, 2005)

Butler i Dressman (2010) su predstavili Razvojni sistem klasifikacije lekova (engl. *Developability classification system*, DCS) koji se pokazao veoma efikasnim u identifikaciji kritičnih faktora koji mogu uticati na kliničke performanse leka. Autori smatraju da permeabilnost i rastvorljivost mogu biti međusobno kompezatorni za lekovite supstance klase 2, te da se kod ovih model supstanci potpuno rastvaranje može postići bilo određenom raspodelom veličine čestica, bilo inovativnom strategijom formulacije.

Varma i sar. (2015) predložili su modifikaciju BDDCS sistema tzv. Prošireni sistem klasifikacije na osnovu klirensa (engl. *Extended Clearance Classification System*, ECCS) gde je akcenat stavljen na klirens lekovite supstance, odnosno kritične faktore koji utiču na klirens lekovite supstance (stepen jonizacije, molekulska masa, permeabilnost), te su lekovite supstance klasifikovane u šest klasa u skladu sa primarnim putem klirensa, odnosno kiselo-baznim karakteristikama lekovite supstance i molekulskom masom.

Macheras i Karalis (2014) su predložili ternarni biofarmaceutski sistem klasifikacije, takozvani AB $\Gamma$  sistem, koji se zasniva na kombinaciji rastvorljivosti i permeabilnosti koja dovodi do procenta intestinalno apsorbovanog leka kategorisanog kao: A:  $F_a \leq 0,20$ ; B:  $0,20 < F_a < 0,90$ ;  $\Gamma$ :  $F_a \geq 0,90$ .

Macheras i sar. (2018) predložili su sistem klasifikacije koji umesto rastvorljivosti koristi brzinu rastvaranja kao kriterijum. Klasifikacija se zasniva na regulatornim zahtevima za *in vitro* brzinu rastvaranja. Predloženi sistem klasifikacije je u potpunosti model nezavistan, odnosno ne zahteva pretpostavljanje mehanizma rastvaranja *in vivo*.

## 2.5 *In vitro* – *in vivo* korelacija

*In vitro* – *in vivo* korelacija (IVIVK) je matematički model kojim se uspostavlja veza između *in vitro* profila brzine rastvaranja i *in vivo* ponašanja leka, najčešće profila koncentracije leka u plazmi. Generalno se smatra da se uspostavljanje IVIVK može očekivati kada je brzina rastvaranja ograničavajući faktor za apsorpciju, kod preparata koji sadrže nisko rastvorljive lekovite supstance i preparata sa modifikovanim oslobađanjem (tabela 2).

Uspostavljanje IVIVK ima za cilj, da se u određenim situacijama, kao što su postregistracione izmene, *in vivo* ponašanje preparata predvidi samo na osnovu rezultata

dobijenih *in vitro* ispitivanjem brzine rastvaranja, bez izvođenja kliničkih studija. Ovakav pristup ima za cilj smanjenje izvođenja studija na zdravim ispitanicima, što takođe ima za posledicu smanjenje ukupnih troškova i vremena neophodnog za dobijanje dozvole za lek. U literaturi se mogu pronaći brojni radovi koji se bave razvojem i upotrebom IVIVK (Davanco i sar, 2020; González-García i sar, 2015; Jacob i Nair, 2018; Kim i sar, 2019; Xu i sar, 2018), a njen značaj prepoznat je i od strane regulatornih tela (FDA, 1997; EMA, 2014).

Tabela 2. Veza između farmaceutskog oblika leka, BCS klase i verovatnoće uspostavljanja IVIVK (preuzeto iz Davanco i sar, 2020)

Farmaceutski oblik	BCS klasa	Verovatnoća razvoja IVIVK	Ograničavajući faktor za apsorpciju
MR	1	Visoka	Brzina rastvaranja
	2	Visoka	Brzina rastvaranja
	3	Ograničena	Permeabilnost
	4	Ograničena	Permeabilnost
IR	1	Ograničena	Brzina pražnjenja želuca
	2	Visoka	Brzina rastvaranja
	3	Ograničena	Permeabilnost
	4	Ograničena	Permeabilnost

MR – preparat sa modifikovanim oslobađanjem (engl. modified release)

IR – preparat sa trenutnim oslobađanjem (engl. immediate release)

U literaturi su opisani različiti nivoi IVIVK, uključujući korelaciju nivoa A, B, C i višestruku korelaciju nivoa C. Korelacija nivoa A predstavlja najviši nivo korelacije i sa industrijskog i regulatornog stanovišta je najprihvatljivija. Korelacija nivoa A se odnosi na uspostavljanje veze između celokupnog *in vitro* profila brzine rastvaranja i *in vivo* profila koncentracije leka u plazmi. Ukoliko između količine rastvorene supstance *in vitro* i količine rastvorene, odnosno, apsorbovane supstance *in vivo* postoji linearan odnos, između datih podataka postoji korelacija nivoa A (FDA, 1997; EMA, 2014). Da bi se uspostavila korelacija nivoa A koja bi bila prihvaćena od strane regulatornih organa u svrhu *biowaiver*-a, ovaj model korelacije mora biti validiran i razvijen na najmanje tri formulacije koje pokazuju različite brzine rastvaranja lekovite supstance (FDA, 1997). Ostali nivoi korelacije imaju manji značaj i ne mogu da se koriste kao osnova za podnošenje zahteva za dobijanje dozvole za *biowaiver*, osim u slučaju višestruke korelacije nivoa C, koja predstavlja uspostavljanje kvantitativnog odnosa između jednog ili više farmakokinetičkih parametara i količine rastvorene lekovite supstance *in vitro* u različitim vremenskim intervalima. Uspostavljanje ovog nivoa IVIVK u većini slučajeva ukazuje i na postojanje IVIVK nivoa A.

Kako profil *in vivo* brzine rastvaranja nije moguće direktno meriti, za njegovu procenu koriste se različiti matematički modeli izračunavanja. Prilikom uspostavljanja IVIVK moguće je primeniti, takozvani, dekonvolucioni ili konvolucioni pristup.

U dekonvolucionom pristupu *in vivo* profil brzine rastvaranja/apsorpcije se procenjuje indirektno, na osnovu podataka o koncentraciji leka u plazmi nakon oralne i intravenske primene preparata (Dunne, 2007). Najčešće se za dekonvoluciju *in vivo* profila koriste Wagner-Nelson metoda, Loo-Riegelman metoda ili numerička dekonvolucija (Wagner i Nelson, 1963; Loo i Riegelman, 1968; Cutler, 1978). Wagner-Nelson metoda se koristi za one lekove čija se farmakokinetika može opisati jednodimenzionalnim modelom i njena prednost je što od *in vivo* podataka zahteva samo profil koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena nakon oralne primene. Loo-Riegelman metoda je bazirana na dvodimenzionalnom farmakokinetičkom modelu i zahteva i podatke nakon intravenske primene leka, što ograničava njenu primenu. Numerička dekonvolucija je model-nezavisna, konvencionalna farmakokinetička metoda u okviru koje se

moraju definisati ulazna funkcija, težinska funkcija i izlazna funkcija. Ulazna funkcija opisuje kinetiku ulaska leka u organizam, odnosno *in vivo* profil rastvaranja ili apsorpcije lekovite supstance nakon oralne primene. Težinska funkcija predstavlja profil koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon oralne ili intravenske primene referentnog rastvora, ili, u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem, tableta ili kapsula sa trenutnim oslobađanjem. Izlazna funkcija opisuje farmakokinetički profil ispitivanog preparata (Abrahamsson i Ungell, 2009). Rezultati dobijeni primenom Wagner-Nelson i Loo-Riegelman metode predstavljaju količinu lekovite supstance koja je apsorbovana i, u slučaju kada permeabilnost nije ograničavajući faktor za apsorpciju, ona je ekvivalentna količini supstance koja je rastvorena *in vivo*. U slučaju lekovitih supstanci kod kojih na apsorpciju, pored brzine rastvaranja, utiču i različiti transportni proteini ili kod kojih postoji presistemski metabolizam u zidu creva, količina apsorbovane i rastvorene lekovite supstance *in vivo* se razlikuju, što otežava uspostavljanje IVIVK (Dokoumetzidis i Macheras, 2008). U slučaju numeričke dekonvolucije dobijeni profil zavisi od referentnog profila koji je korišćen kao težinska funkcija za dekonvoluciju. U slučaju kada se kao referentni koristi profil koncentracije leka u plazmi nakon intravenske primene, dobija se *in vivo* profil apsorpcije, dok se u slučaju korišćenja profila nakon primene oralnog rastvora dobija profil brzine rastvaranja lekovite supstance.

U konvolucionom pristupu vrši se poređenje *in vivo* profila koncentracije lekovite supstance u toku vremena sa profilom koncentracije predviđenim na osnovu podataka dobijenih *in vitro* ispitivanjem brzine rastvaranja (Dunne, 2007). Prednost ove metode je što ne zahteva primenu referentnog preparata, pri čemu se, kao i kod dekonvolucionog pristupa, podrazumeva da je sistem linearan.

Odnos između *in vivo* i *in vitro* profila se zatim procenjuje korišćenjem linearne regresione analize. U okviru dekonvolucionog pristupa, kako bi se kompenzovala eventualna disproporcija između *in vivo* i *in vitro* profila, može se primeniti odgovarajuće skaliranje vremenske ose.

Tradicionalne dekonvolucione i konvolucione metode pogodne su za primenu kod lekovitih supstanci koje pokazuju linearnu farmakokinetiku. Međutim, u slučaju lekovitih supstanci koje pokazuju složeniju, tzv. nelinearnu farmakokinetiku uspostavljanje IVIVK može izostati (Kakhi i sar, 2013). Razvoj PBPK/PBBM modelovanja omogućio je model nezavisnu, mehanističku procenu *in vivo* input profila na osnovu fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih svojstava lekovite supstance čime se prevazilaze određena ograničenja konvencionalnog pristupa zasnovanog na dekonvoluciji. Ovi modeli imaju mogućnost da simuliraju regionalne razlike u apsorpciji, aktivni transport, metabolizam prvog prolaza i dr. i ove procese razmatraju odvojeno od brzine rastvaranja, te se naročito ističe njihov značaj u razvoju IVIVK kod lekovitih supstanci koje pokazuju nelinearnu farmakokinetiku (Kesisoglou i sar, 2015; Patel i sar, 2014; Sjögren i sar, 2014; Bermejo i sar, 2020).



# CILJ RADA

Opšti cilj eksperimentalnog rada je procena mogućnosti primene mehanističkog *in vitro* – *in vivo* – *in silico* modelovanja u razvoju *in vitro* metoda za ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata koje omogućavaju predviđanje *in vivo* ponašanja leka i identifikaciju klinički relevantnih specifikacija za izabrane model lekovite supstance koje pokazuju različite biofarmaceutske karakteristike.

Ispitivanjem su obuhvaćeni sledeći pojedinačni ciljevi:

- opsežna analiza dostupnih literaturnih podataka koji se odnose na fizičko-hemijske, biofarmaceutske i farmakokinetičke karakteristike ispitivanih lekovitih supstanci;
- procena uticaja eksperimentalnih uslova ispitivanja (izbor aparature i medijuma) na brzinu rastvaranja ispitivanih lekovitih supstanci iz tableta;
- razvoj i validacija *in silico* modela za predviđanje apsorpcije ispitivanih lekovitih supstanci i identifikacija hipotetičkih profila brzine rastvaranja/apsorpcije lekovitih supstanci *in vivo*;
- procena mogućnosti uspostavljanja IVIVK za lekovite supstance koje pokazuju različite biofarmaceutske karakteristike, identifikacija *in vitro* metoda ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance koje omogućavaju predviđanje *in vivo* ponašanja leka i uspostavljanje klinički relevantnih specifikacija.

# **EKSPERIMENTALNI DEO**

## 3. Materijal i metode

### 3.1 Materijal

Za ispitivanje su korišćeni komercijalno dostupni uzorci tableta ispitivanih lekovitih supstanci sa dozvolom za lek u Republici Srbiji (pregled ispitivanih lekovitih supstanci i preparata prikazan je u tabeli 3). Podaci o sastavu ispitivanih uzoraka prikazani su u okviru Priloga 1.

Tabela 3. Pregled ispitivanih lekovitih supstanci i preparata

Lekovita supstanca	Oznaka preparata	Farmaceutski oblik leka
paracetamol	P	film tablete
acetilsalicilna kiselina	AK	neobložene tablete
amlodipin-besilat	AB	neobložene tablete
ibuprofen	I1	film tablete
	I2	tablete sa produženim oslobađanjem
	I3	tablete sa produženim oslobađanjem
karbamazepin	K	neobložene tablete
nimesulid	N	neobložene tablete
metformin-hidrohlorid	M1	film tablete
	M2	film tablete
atenolol	A	film tablete
ranitidin-hidrohlorid	R1	film tablete
	R2	film tablete
ciprofloksacin-hidrohlorid	C1	film tablete
	C2	film tablete

Za pripremu medijuma za ispitivanje raspadljivosti i brzine rastvaranja korišćene su sledeće supstance: natrijum-hlorid (Riedel-de Haën, Nemačka), hlorovodonična kiselina (Centrohema, Srbija), kalijum-dihidrogenfosfat (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka), natrijum-hidroksid (Centrohema, Srbija), glacijalna sirćetna kiselina (99,8 % p.a, Lachema, Češka), L- $\alpha$  fosfatidilholin poreklom iz jajeta (min 60 % TLC, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka), natrijumova so tauroholne kiseline (Fluka Chemie AG, Buchs, Švajcarska), hidroksipropilmetilceluloza (HPMC, Methocel K4M, Colorcon Co, Velika Britanija). Za izradu standardnih rastvora za kalibracione krive korišćeni su referentni standardi ispitivanih lekovitih supstanci.

Za pripremu mobilnih faza za određivanje lekovitih supstanci u uzorcima HPLC metodom korišćen je acetonitril (99,9 %) proizvođača Merck KGaA (Darmstadt, Nemačka).

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 *In vivo* podaci

Opsežan pregled literaturnih *in vivo* podataka ispitivanih model supstanci sproveden je korišćenjem baza podataka: *PubMed*, *Scopus*, *Science Direct*. Za pretragu su primenjene sledeće ključne reči, odnosno njihove kombinacije: *paracetamol/acetaminophen*, *acetylsalicylic acid*, *amlodipine besylate*, *ibuprofen*, *carbamazepine*, *nimesulide*, *metformin hydrochloride*, *atenolol*, *ranitidin hydrochloride*, *ciprofloxacin hydrochloride*, *absorption*, *bioavailability*, *permeability*, *dissolution*, *solubility*, *pharmacokinetics*, *bioequivalence*, *partition coefficient*, *distribution*,

*clearance*. Pristup bazama podataka omogućen je posredstvom Konzorcijuma biblioteka Srbije za objedinjenu nabavku (KOBSON).

## 3.2.2 Konvencionalna farmakokinetička analiza

### 3.2.2.1 Metoda Wagner-Nelson

Wagner-Nelson metoda je model-zavisna metoda dekonvolucije profila koncentracije leka u plazmi koja se zasniva na jednodimenzionalnom farmakokinetičkom modelu. Ova metoda podrazumeva da je količina apsorbovanog leka u sistemskoj cirkulaciji u trenutku  $t$  jednaka sumi količine leka u organizmu i kumulativne količine eliminisanog leka do tog trenutka (Wagner i Nelson, 1963). Za izračunavanje nije neophodno poznavanje *in vivo* profila nakon intravenske primene leka. Frakcija apsorbovanog leka  $F_a$  može se izračunati primenom sledeće jednačine:

$$F_a(t) = \frac{c_p + k_{el} \int_0^t C dt}{k_{el} \int_0^{\infty} C dt} \quad \text{[jednačina 1]}$$

U ovom istraživanju metoda Wagner-Nelson je primenjena upotrebom softverskog paketa Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.2.2.2 Metoda Loo-Riegelman

Loo-Riegelman metoda je model-zavisna metoda dekonvolucije profila koncentracije leka u plazmi i zasniva se na dvodimenzionalnom farmakokinetičkom modelu. Ova metoda zahteva poznavanje *in vivo* koncentracija leka nakon oralne i intravenske primene (Loo i Riegelman, 1968). Stepen apsorpcije leka može se izračunati primenom sledeće jednačine:

$$F_a(t) = \frac{c + k_{10} \int_0^t C dt + k_{12} e^{-k_{21}t} \int_0^t C e^{k_{21}t} dt}{k_{10} \int_0^{\infty} C dt} \quad \text{[jednačina 2]}$$

U ovom istraživanju metoda Loo-Riegelman je primenjena upotrebom komercijalno dostupnog programa Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.2.2.3 Numerička dekonvolucija

Numerička dekonvolucija je model-nezavisna farmakokinetička metoda za izračunavanje *in vivo* profila brzine rastvaranja ili apsorpcije. U ovoj metodi definisane su tri osnovne komponente, i to: ulazna funkcija, težinska funkcija i izlazna funkcija. Ulazna funkcija opisuje kinetiku ulaska leka u organizam, odnosno *in vivo* profil rastvaranja ili apsorpcije ispitivanog preparata nakon oralne primene. Težinska funkcija predstavlja profil koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon oralne ili intravenske primene referentnog rastvora, ili, u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem, tableta ili kapsula sa trenutnim oslobađanjem. Izlazna funkcija opisuje farmakokinetički profil ispitivanog preparata.

Kada se kao težinska funkcija koristi farmakokinetički profil nakon oralne primene referentnog rastvora (ili, preparata sa trenutnim oslobađanjem), numeričkom dekonvolucijom se dobija hipotetički *in vivo* profil brzine rastvaranja lekovite supstance. Ukoliko se kao težinska funkcija u numeričkoj dekonvoluciji koristi farmakokinetički profil nakon intravenske primene referentnog rastvora, dobija se *in vivo* profil apsorpcije ispitivane lekovite supstance.

Stepen i brzina rastvaranja, odnosno apsorpcije lekovite supstance se izračunavaju kao suma odgovora na jedinični impuls (težinsku funkciju,  $C_\delta$ ), na osnovu sledeće jednačine:

$$c(t) = \int_0^t f(\tau) c_\delta(t - \tau) d\tau \quad \text{[jednačina 3]}$$

U ovom istraživanju numerička dekonvolucija je primenjena upotrebom programskog paketa Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.2.3 Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta

Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanih preparata sprovedeno je pod različitim eksperimentalnim uslovima na temperaturi  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Primenjeni su sledeći uređaji i uslovi ispitivanja<sup>1</sup>:

- aparatura sa lopaticom/aparatura 2 (Erweka DT 70) pri brzini od 50 obrtaja/min, sa 500 ml medijuma (fiziološki zasnovani medijumi sa i bez dodatka lecitina i tauroholata, bFeSSIF sa dodatkom 0,5% HPMC-a, kao i medijumi koji su za ispitivane model supstance predloženi u farmakopejama i to: fosfatni pufer pH vrednosti 6,8 (FP 6,8), fosfatni pufer pH vrednosti 5,8 (FP 5,8), fosfatni pufer pH vrednosti 7,4 (FP 7,4), acetatni pufer pH vrednosti 4,6 (AcP 4,6), voda i 0,01 M HCl (BP, 2022; USP 44-NF39, 2021). U tabeli 4 prikazan je sastav i karakteristike fiziološki zasnovanih medijuma koji simuliraju: želudačni sok na gladno (*Fasted State Simulated Gastric Fluid*, FaSSGF), crevni sok na gladno (*Fasted State Simulated Intestinal Fluid*, FaSSIF), i nakon obroka (*Fed State Simulated Intestinal Fluid*, FeSSIF),
- aparatura sa protočnom ćelijom/aparatura 4 (CE 7 Smart, Sotax) sa ćelijama veličine 22,6 mm i protokom medijuma od 4, odnosno 8 ml/min (otvoren sistem) uz izmenu medijuma (15 min bFaSSGF, 45 min bFaSSIF),
- aparatura sa staklenim kuglicama/aparatura K konstruisana i patentirana od strane Bogataj i sar. (2010), pri protoku medijuma od 2 ml/min, korišćenjem 15, 25, 50 odnosno 100 g staklenih kuglica i pri brzini rotacije magneteta 15, odnosno 50 obrtaja/min uz izmenu medijuma (15 min bFaSSGF, 45 min bFaSSIF).

Tabela 4. Sastav i karakteristike fiziološki zasnovanih medijuma

	FaSSGF <sup>a</sup>	FaSSIF <sup>b</sup>	FeSSIF <sup>b</sup>	SCoF <sup>c</sup>
Natrijum-tauroholat (mM)	0,08	3	15	
Lecitin (mM)	0,02	0,75	3,75	
Sirćetna kiselina (mM)			144,00	170
Kalijum-dihidrogenfosfat (mM)		28,7		
NaOH (mM)		13,8	qs	157
HCl (mM)	qs		qs	
Natrijum-hlorid (mM)	34,2			
Kalijum-hlorid (mM)			204	
Osmolalnost (mOsm/kg)	121	270	635	
Kapacitet pufera		12	76,00	
pH	1,6	6,5	5,0	5,8

<sup>a</sup>Vertzoni i sar, 2005; <sup>b</sup>Galia i sar, 1998; <sup>c</sup>Fotaki i sar, 2005

U slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem ibuprofena korišćena je i aparatura sa cilindrom sa povratnim kretanjem/aparatura 3 (BioDis, Vankel) korišćenjem 10, odnosno 20 uranjanja/min i 240 ml medijuma u svakoj čaši (voda, kao i izmena medijuma 15 min bFaSSGF (odnosno FaSSGF), 3 h bFaSSIF (odnosno FaSSIF), a potom je do kraja ispitivanja korišćen medijum koji simulira sadržaj kolona (*Simulated Colonic Fluid*, SCoF).

<sup>1</sup> Fiziološki zasnovani medijumi koji ne sadrže lecitin i tauroholat označeni su prefiksom b.

Tabela 5. Prikaz eksperimentalnih uslova koji su korišćeni u *in vitro* ispitivanju brzine rastvaranja kod pojedinih uzoraka tableta

Hidrodinamika	Medijum	P	AK	I1	I2	I3	K	N	AB	M1	M2	A	R1	R2	C1	C2	
<b>Aparatura 2</b>																	
50 o/min	500 ml bFaSSGF	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
	500 ml FaSSGF	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
	500 ml bFaSSIF	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
	500 ml FaSSIF	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
	500 ml bFeSSIF	√	√	√			√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
	500 ml FeSSIF	√	√	√			√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
	500 ml bFeSSIF/0,5% HPMC	√	√	√			√	√	√			√	√	√	√	√	
	500 ml FP pH 5,8	√	√	√	√	√	√										
	500 ml FP pH 7,2			√	√	√											
	500 ml voda				√	√								√	√		
	500 ml AcP pH 4,6												√				
500 ml 0,01 M HCl															√	√	
75 o/min	1000 ml FP pH 6,8									√	√						
<b>Aparatura 3</b>																	
10 u/min	voda				√	√											
10 u/min	15 min bFaSSGF/3h bFaSSIF/9h SCoF				√	√											
20 u/min	15 min bFaSSGF/3h bFaSSIF/9h SCoF				√	√											
<b>Aparatura 4</b>																	
4 ml/min, otvoren sistem	15 min bFaSSGF/ 45 min bFaSSIF	√	√	√			√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
8 ml/min, otvoren sistem	15 min bFaSSGF/ 45 min bFaSSIF	√	√	√			√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
4 ml/min, otvoren sistem	voda				√	√											
8 ml/min, otvoren sistem	voda				√	√											
8 ml/min, otvoren sistem	15 min bFaSSGF/3h bFaSSIF/9h SCoF				√	√											
<b>Aparatura K</b>																	
100 g kuglica, 50 o/min, 2 ml/min	15 min bFaSSGF/45 min bFaSSIF									√	√						
50 g kuglica, 50 o/min, 2 ml/min	15 min bFaSSGF/45 min bFaSSIF			√						√	√						
25 g kuglica, 50 o/min, 2 ml/min	15 min bFaSSGF/45 min bFaSSIF			√						√	√						
15 g kuglica, 50 o/min, 2 ml/min	15 min bFaSSGF/45 min bFaSSIF			√													
25 g kuglica, 15 o/min, 2 ml/min	15 min bFaSSGF/45 min bFaSSIF									√	√						
25 g kuglica, 15 o/min, 2 ml/min	15 min bFaSSGF/3h bFaSSIF/9h SCoF				√	√											
50 g kuglica, 50 o/min, 2 ml/min	15 min bFaSSGF/3h bFaSSIF/9h SCoF				√	√											

Za ispitivanje su korišćene po tri tablete. Uzorci medijuma su nakon uzorkovanja filtrirani (0,45 µm PVDF filter, 25 mm GD/X, Whatman) i u njima je pogodnom metodom određena koncentracija ispitivane lekovite supstance. Sadržaj lekovite supstance u uzorcima određivan je UV spektrofotometrijski (UV Spectrophotometer Cary 50, Varian) na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije, ili primenom visoko efikasne tečne hromatografije (HPLC) sa PDA detekcijom (Prostar 330, Varian). U svim određivanjima HPLC metodom korišćena je kolona X Bridge C18, dimenzija 4,6 mm x 50 mm. U slučaju ibuprofena mobilna faza sastojala se od acetonitrila i fosfatnog pufera pH 3,0 u odnosu 30 : 70, sa brzinom protoka 1,0 ml/min. Zapremina injektovanja iznosila je 10 µL, a talasna dužina detekcije 265 nm. U slučaju acetilsalicilne kiseline mobilna faza sastojala se od acetonitrila i fosfatnog pufera pH 3,0 u odnosu 20 : 80, sa brzinom protoka 1,0 ml/min. Zapremina injektovanja iznosila je 10 µL, a talasna dužina detekcije 280 nm. U slučaju nimesulida mobilna faza sastojala se od acetonitrila i fosfatnog pufera pH 7,0 u odnosu 35 : 65, sa brzinom protoka 1,0 ml/min. Zapremina injektovanja iznosila je 10 µL, a talasna dužina detekcije 230 nm. Svaka analitička serija podrazumevala je analizu serije standardnih rastvora kako bi se konstruisale kalibracione krive, a potom analizu ispitivanih uzoraka i medijuma.

Kako bi se stekao uvid u potencijalni uticaj izabranih medijuma na raspadljivost tableta, sprovedeno je ispitivanje raspadljivosti tableta uz korišćenje medijuma koji su primenjeni za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta. Ispitivanje raspadljivosti izvedeno je u uređaju za ispitivanje raspadljivosti (Erweka ZT 500 series) na 37±0,5°C. Ispitivanja su izvedena na uzorku od šest tableta.

### 3.2.4 *In silico* ispitivanje

Cilj *in silico* ispitivanja bio je razvoj i validacija modela gastrointestinalne (GI) simulacije apsorpcije izabranih model supstanci korišćenjem dva programska paketa (Simcyp® i GastroPlus™) u cilju mehanističke interpretacije apsorpcije lekovite supstance, identifikacije bioprediktivne metode i postavljanja klinički relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta.

#### 3.2.4.1 Simcyp® programski paket

Programski paket Simcyp® Population-Based Simulator (verzija 13.2; Certara™, SAD) korišćen je za izvođenje *in silico* modelovanja apsorpcije ispitivanih lekovitih supstanci, kao i predviđanje profila njihove koncentracije u plazmi. Kao ulazni parametri za simulacije korišćeni su literaturni podaci o fizičko-hemijskim, biofarmaceutskim i farmakokinetičkim osobinama ispitivanih supstanci, *in silico* predviđene vrednosti, kao i eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja. U simulacijama je kao model apsorpcije korišćen ADAM model, dok je distribucija u različita tkiva i organe opisana potpunim PBPK modelom. Simulacije su izvedene za reprezentativnog pojedinca populacije.

U početnoj fazi istraživanja su za ispitivane model supstance razvijeni modeli GI simulacije za preparate sa trenutnim oslobađanjem. Modeli su potom validirani izračunavanjem greške predviđanja (*Prediction Error*, %PE) relevantnih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $PIK_{0-t}$ ). Greška predviđanja je izračunata kao relativni odnos razlike stvarne vrednosti farmakokinetičkih parametara izražene kao srednja vrednost uočena u okviru *in vivo* studije i *in silico* predviđene vrednosti prema sledećem izrazu (FDA, 1997):

$$PE(\%) = \frac{\text{stvarna} - \text{previđena vrednost}}{\text{stvarna vrednost}} \times 100 \quad [\text{jednačina 4}]$$

U slučaju ibuprofena urađena je potom analiza osetljivosti simuliranih parametara (*Automated Sensitivity Analysis, ASA*) kako bi se procenio uticaj odabranih ulaznih parametara na  $C_{max}$ ,  $PIK_{0-t}$  i procenat apsorbovanog leka. Model je u narednoj fazi prilagođen za simulaciju apsorpcije iz preparata sa produženim oslobađanjem.

Razvijeni i validirani Simcyp<sup>®</sup> modeli korišćeni su za identifikaciju hipotetičkih *in vivo* profila apsorpcije i uporednu analizu sa profilima dobijenim primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda i GastroPlus<sup>™</sup> programskog paketa. Modeli su takođe korišćeni za simulaciju profila koncentracije lekovitih supstanci u plazmi za različite *in vitro* profile brzine rastvaranja koji su potom upoređeni sa *in vivo* profilima objavljenim u literaturi u cilju uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije.

### 3.2.4.2 GastroPlus<sup>™</sup> programski paket

Programski paket GastroPlus<sup>™</sup> (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) je takođe korišćen za GI simulacije apsorpcije ispitivanih lekovitih supstanci u cilju određivanja profila apsorpcije lekovite supstance u organizmu, kao i predviđanja profila koncentracije lekovite supstance u plazmi. U razvoju modela korišćeni su isti setovi ulaznih podataka kao i u slučaju Simcyp<sup>®</sup> programskog paketa. U simulacijama su korišćeni ACAT (engl. *Advanced Compartmental Absorption and Transit Time*, ACAT) model apsorpcije i PBPK model distribucije. Za procenu promena u permeabilnosti kroz različite delove gastrointestinalnog trakta za neke od model supstanci izabran je Opt logD Model SA/V 6.1, dok je kod ostalih vrednost ASF faktora (engl. *Absorption Scale Factor*) optimizovana. Pri razvoju lek-specifičnih PBPK modela korišćena je opcija “*IR tablet mode*”. Međutim, kako ova opcija ne omogućava unos *in vitro* profila brzine rastvaranja kao ulaznog parametra, kod predviđanja *in vivo* profila koncentracije u funkciji vremena na osnovu podataka o brzini rastvaranja iz tableta korišćena je “*CR-dispersed*” opcija. “*CR*” opcija simulira oslobađanje rastvorene lekovite supstance (GastroPlus<sup>™</sup> User Manual v 8.0). Za predviđanje apsorpcije lekovite supstance korišćen je modul pojedinačne simulacije (*Single Simulation Mode*), koji predviđa profil koncentracije lekovite supstance u funkciji vremena.

Modeli razvijeni korišćenjem GastroPlus<sup>™</sup> programskog paketa su takođe validirani izračunavanjem greške predviđanja relevantnih farmakokinetičkih parametara na osnovu jednačine 4. Razvijeni i validirani GastroPlus<sup>™</sup> modeli korišćeni su za identifikaciju hipotetičkih *in vivo* profila apsorpcije i uporednu analizu sa profilima dobijenim primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda i Simcyp<sup>®</sup> programskog paketa. Modeli su takođe korišćeni za simulaciju profila koncentracije lekovite supstance u plazmi za različite *in vitro* profile brzine rastvaranja. Simulirani farmakokinetički profili su potom upoređeni sa *in vivo* profilima objavljenim u literaturi u cilju uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije.

### 3.2.5 Uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka primenjeni su dekonvolucioni i konvolucioni pristup.

#### 3.2.5.1 Dekonvolucioni pristup

Kod dekonvolucionog pristupa, hipotetički profili brzine rastvaranja/apsorpcije dobijeni konvencionalnom farmakokinetičkom analizom ili *in silico* modelovanjem upoređeni su sa eksperimentalno dobijenim profilima brzine rastvaranja iz ispitivanih preparata pri različitim eksperimentalnim uslovima. Kod preparata sa trenutnim oslobađanjem zbog razlike u vremenu rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenske skale koje prikazuju *in vitro* podatke korigovane su faktorom korekcije vremenske skale (*Time Scaling Factor, TS*). Hipotetički input



profili dobijeni korišćenjem različitih metoda dekonvolucije, kao i eksperimentalni profili brzine rastvaranja fitovani su korišćenjem Weibull-ove distribucije (jednačina 5) (Lagenbucher, 1972).

$$W_t = W_{\max} \left[ 1 - e^{-\left(\frac{t}{\tau_d}\right)^\beta} \right] \quad \text{[jednačina 5]}$$

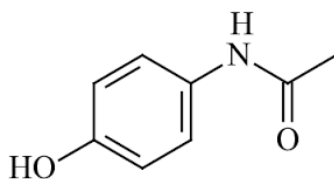
gde je  $W_t$  frakcija leka koja je rastvorena/apsorbovana u trenutku  $t$ ,  $W_{\max}$  je maksimalna kumulativna frakcija leka koja je rastvorena/apsorbovana,  $\tau_d$  je vremenski parametar, odnosno daje informaciju o brzini procesa i  $\beta$  je parametar koji opisuje oblik krive ( $\beta=1$ , kriva odgovara eksponencijalnoj;  $\beta>1$  kriva je sigmoidna; i  $\beta<1$  kriva je parabola). Profili su fitovani upotrebom *Sigmoidal-Weibull* opcije (uz podešavanje  $t_{\text{lag}}$  na 0, s obzirom da profili ne pokazuju vreme odlaganja) u OriginPro<sup>®</sup> programskom paketu, verzija 8 (OriginLab<sup>®</sup>, USA). Faktori skaliranja vremenske ose izračunati su potom kao odnos  $\tau_{\text{divivo}}$  i  $\tau_{\text{divitro}}$ .

Linearnom regresionom analizom određeni su statistički parametri korelacije *in vitro* i *in vivo* podataka odnosno, nagib krive regresije,  $a$  i koeficijent korelacije,  $r$ .

### 3.2.5.2 Konvolucionni pristup

U slučaju konvolucionog pristupa, profili koncentracije lekovitih supstanci u plazmi koji su predviđeni primenom *in silico* modelovanja su upoređeni sa srednjim profilom koncentracije lekovite supstance u plazmi uočene u okviru *in vivo* studija čiji su rezultati dostupni u literaturi. Linearnom regresionom analizom određeni su statistički parametri korelacije (nagib krive regresije,  $a$  i koeficijent korelacije,  $r$ ).

## 4.1 MODEL SUPSTANCA: PARACETAMOL



N-acetil-para-aminofenol

Slika 11. Strukturna formula i hemijski naziv paracetamola

Paracetamol je analgetik i antipiretik koji se koristi za ublažavanje blagih i umerenih bolova različitog porekla i za suzbijanje groznice, snižavanje povišene temperature i kod tegoba vezanih za prehladu i grip. Može se koristiti i kao simptomatska terapija blagih do umerenih bolova kod osteoartritisa. Uobičajna doza za odrasle je 500 ili 1000 mg, 3 do 4 puta dnevno, pri čemu se ne sme prekoračiti dnevna doza od 4 g (Farmakoterapiski vodič, 2022). Detaljan pregled fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i biofarmaceutskih svojstava paracetamola prikazan je u okviru odgovarajuće FIP Biowaiver monografije (Kalantzi i sar, 2006).

### 4.1.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva paracetamola

Literaturni podaci o rastvorljivosti paracetamola ukazuju na to da se jedan deo paracetamola rastvara se u 70 delova vode na sobnoj temperaturi (El Obeid i Al-Bard, 1985), dok je u ključaloj vodi rastvorljivost 1 u 20 delova (Martindale, 2020). Drugi izvori navode da je rastvorljivost paracetamola u vodi 14,7 mg/ml na 20°C (Etman i Naggar, 1990), 14,3 mg/ml na 25°C (Garekani i sar, 2003), odnosno 23,7 mg/ml na 37°C (Etman i Naggar, 1990). Prikazane vrednosti rastvorljivosti ukazuju da bi se maksimalna doza rastvorila u zapremini manjoj od 250 ml, što ga svrstava u visoko rastvorljive lekovite supstance u skladu sa kriterijumima BCS. Log P (n-octanol/voda) iznosi 0,2 (Poelma i sar, 1991). pKa na 25°C iznosi 9,5 (Martindale, 2020; Vozech i sar, 1988), te se, kao slaba kiselina, u fiziološkom opsegu pH vrednosti nalazi u nejonizovanom obliku i pokazuje pH nezavisnu rastvorljivost.

U stanju na gladno apsolutna biološka raspoloživost kreće se u opsegu 62-89% (Eandi i sar, 1984; Clements i sar, 1984; Perucca i Richens, 1979). Nepotpuna biološka raspoloživost pripisuje se presistemskom metabolizmu koji iznosi oko 20% nakon oralne primene leka (Korteljärvi i sar, 2005; Clements i sar, 1984; Martindale, 2020). Maksimum koncentracije u plazmi postiže se između 0,17-1,2 h nakon uzimanja leka (Eandi i sar, 1984; Zapater i sar, 2004; Dalton i sar, 2001; Grattan i sar, 2000, Clements i sar, 1978, Torrado i sar, 2001). Istraživanja ukazuju da apsolutna biološka raspoloživost ne varira značajno kada se lek primenjuje u dozama 5-20 mg/kg (Clements i sar, 1984), dok je u drugoj studiji pokazano da prilikom uzimanja doza od 325-2000 mg ova lekovita supstanca pokazuje dozno zavisnu farmakokinetiku (Clements i sar, 1984). Istovremenim uzimanjem sa hranom dolazi do povećanja  $t_{max}$  uz značajno smanjenje  $C_{max}$  vrednosti (Rostami-Hodjegan i sar, 2002; Stillings i sar, 2000), usled produženog zadržavanja leka u želucu (Willems i sar, 2001). Hrana ne utiče na ukupnu količinu lekovite supstance koja dospeva u sistemsku cirkulaciju (Rostami-Hodjegan i sar, 2002; Stillings i sar, 2000).

Tehnikom jednosmerne perfuzije (engl. *Single-Pass Intestinal Perfusion*, SPIP) na pacovima izmerena je permeabilnost paracetamola od  $0,86 \pm 0,5 \cdot 10^{-4}$  cm/s (Stewart i sar, 1995). Korišćenjem metode perfuzije na izolovanom jejunumu pacova dobijena je efektivna

permeabilnost od  $0,54 \cdot 10^{-4}$  cm/s (Amidon i sar, 1995). Ovi rezultati ukazuju da se paracetamol može svrstati u nisko permeabilne lekovite supstance jer je vrednost permeabilnosti niža od granične koja iznosi  $2-4 \cdot 10^{-4}$  cm/s (Amidon i sar, 1995). Gramatté i Richter (1994) su metodom ravnotežne perfuzione tehnike došli do vrednosti efektivne permeabilnosti paracetamola u jejunumu od  $4,8 \cdot 10^{-4}$  cm/s, što je iznad kritične vrednosti. Drugi kriterijum na osnovu koga se procenjuje permeabilnost je procenat absorbovanog leka koji iznosi oko 80%, što je nešto ispod granične vrednosti od 85% za visoko permeabilne lekovite supstance (EMA, 2020). Time bi se paracetamol mogao svrstati u klasu 1 ili klasu 3 BCS.

Prividni volumen distribucije paracetamola kreće se u opsegu 0,6-1,36 L/kg (Vozech i sar, 1988; Zapater i sar, 2004; Clements i Prescott, 1976; Rumack, 2004; Forrest i sar, 1982). Vezivanje za proteine plazme iznosi 20-25% pri uobičajnom doziranju. Vezivanje za crvena krvna zrnca iznosi 10-20% (Forrest i sar, 1982). Paracetamol prolazi kroz placentu, a prisutan je i u mleku gde je čak 85% leka vezano za proteine mleka (Bailey i Baggs, 2004).

Najveći procenat paracetamola (između 85-90%) metaboliše se delovanjem mikrozomalnih enzima u jetri, gde podleže glukurodinaciji i sulfonovanju u neaktivne metabolite koji se eliminišu urinom. Vrlo mali procenat leka podleže konjugaciji sa cisteinom i tiolnom kiselinom (Forrest i sar, 1982).

#### 4.1.2 *In vivo* podaci

Detaljnim pregledom *in vivo* studija dostupnih u literaturi za različite farmaceutske oblike paracetamola, izabrani su profili koncentracije paracetamola u plazmi koji će se koristiti kao referentni. U cilju biofarmaceutske karakterizacije korišćeni su literaturni profili koncentracija paracetamola u plazmi dobijeni nakon intravenske primene (Singla i sar, 2012) i oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem (Portolés i sar, 2003) prikazani u tabeli 6.

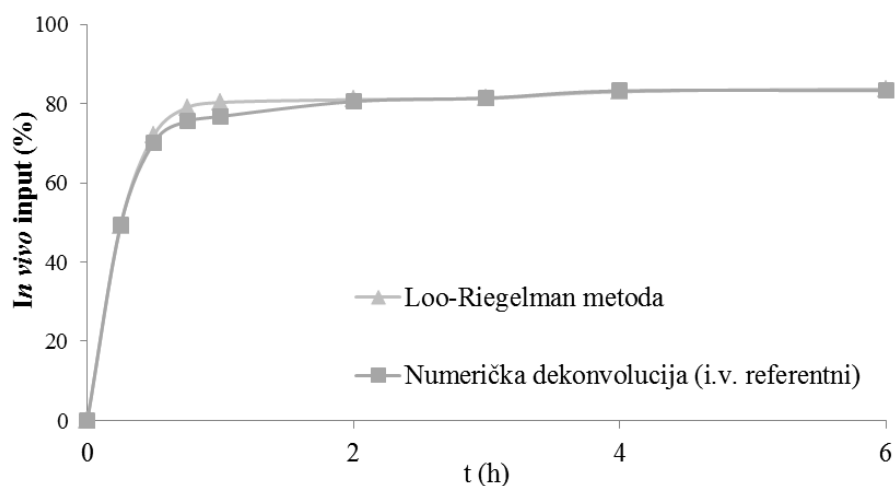
Portolés i sar. (2003) poredili su farmakokinetiku originatorskog preparata i novorazvijene formulacije tableta sa trenutnim oslobađanjem paracetamola. Rezultati su pokazali značajno brže postizanje maksimuma koncentracije leka u plazmi za novorazvijenu formulaciju što je od značaja za brzo postizanje analgetičkog i antipiretičkog efekta.

Tabela 6. Farmakokinetički parametri izabranih preparata paracetamola

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	Referenca
i.v. bolus injekcija (1000 mg)	50,0	21,6	2,17	/	Singla i sar, 2012
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (500 mg)	28,49	8,33	2,53	0,98	Portolés i sar, 2003

#### 4.1.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila paracetamola dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

U cilju izračunavanja hipotetičkih *in vivo* profila apsorpcije paracetamola primenjene su Loo-Riegelman metoda i numerička dekonvolucija gde je kao težinska funkcija korišćen profil dobijen nakon intravenske primene 1000 mg paracetamola. Navedena izračunavanja vršena su upotrebom softverskog paketa Kinetica 5.0 i literaturnih profila koncentracija paracetamola u plazmi iz studija Singla i sar (2012) i Portoles i sar (2003). S obzirom da distribucija paracetamola odgovara dvoprostornom modelu, Wagner-Nelson metoda nije primenljiva (Borin i Ayers, 1989). *In vivo* input profili koji predstavljaju hipotetičke profile apsorpcije paracetamola dobijene Loo-Riegelman metodom, odnosno numeričkom dekonvolucijom na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene kao težinske funkcije prikazani su na slici 12.



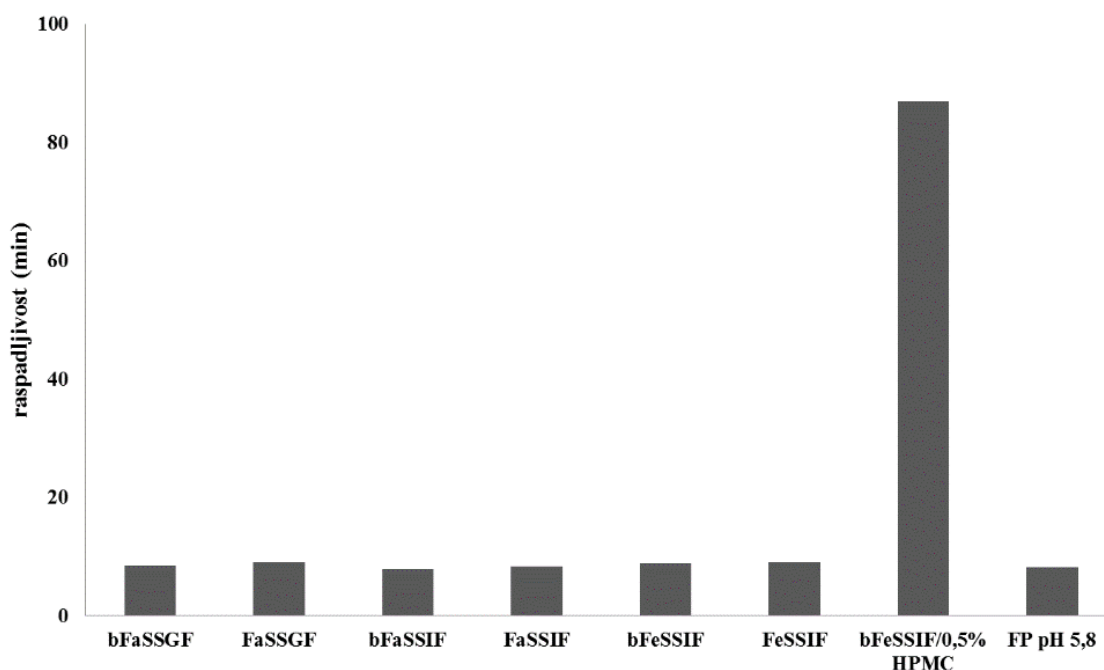
Slika 12. Hipotetički profili apsorpcije paracetamola za tablete sa trenutnim oslobađanjem (Portolés i sar, 2003) dobijeni primenom različitih farmakokinetičkih metoda

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 12 može se uočiti da su input profili dobijeni primenom Loo-Riegelman metode i numeričkom dekonvolucijom u odnosu na profil nakon intravenske primene gotovo podudarni. Oba profila ukazuju na biološku raspoloživost od oko 80% što odgovara literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti paracetamola.

#### 4.1.4 *In vitro* ispitivanja

##### Raspadljivost tableta

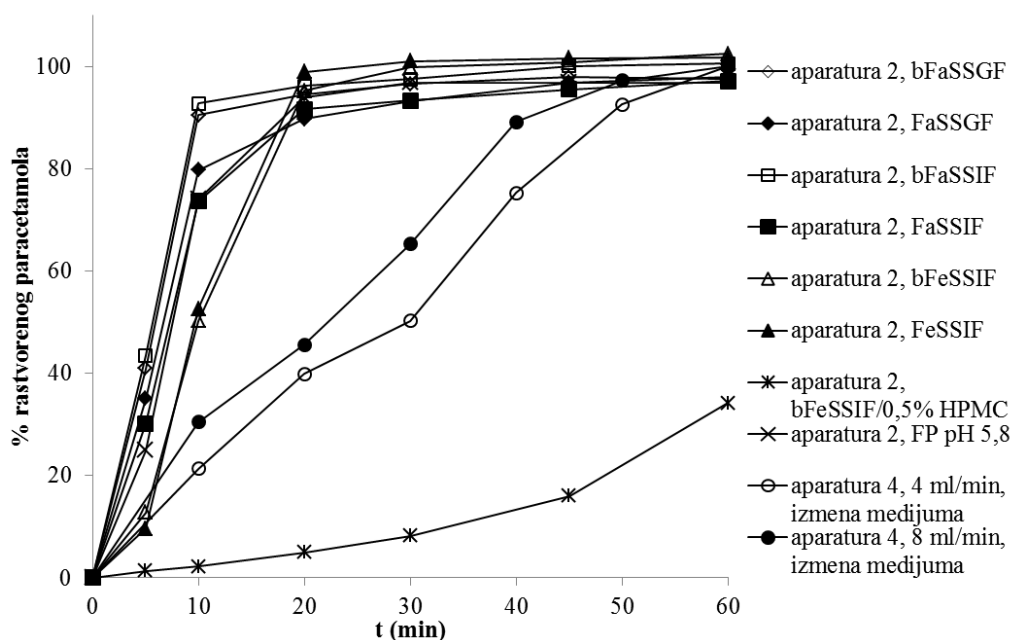
Na slici 13 prikazani su rezultati ispitivanja raspadljivosti film tableta paracetamola u različitim medijumima. Tablete se u svim ispitivanim medijumima izuzev viskoznog raspadaju za oko 8 min, dok dodatak HPMC-a u medijum značajno usporava raspadanje tableta (vreme raspadanja je 87 min). Parojčić i sar. (2008) pripisali su ovakve rezultate smanjenom kvašenju, kao i usporenoj penetraciji tečnosti u tabletu kada se koristi viskozni medijum.



Slika 13. Raspadljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem paracetamola u različitim medijumima

## Brzina rastvaranja paracetamola iz tableta

Ekperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja paracetamola iz film tableta u: (1) aparaturi sa lopaticom (u različitim medijumima) i (2) aparaturi sa protočnom ćelijom (uz korišćenje izmene medijuma: 15 min bFaSSGF / 45 min bFaSSIF) prikazani su na slici 14.



Slika 14. Profili brzine rastvaranja paracetamola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni korišćenjem različitih eksperimentalnih uslova

Prikazani rezultati ukazuju da u aparaturi sa lopaticom rastvaranje paracetamola odgovara veoma brzom rastvaranju (više od 85% za 15 min) uz vrlo neznatne razlike u brzini rastvaranja u zavisnosti od sastava i pH vrednosti medijuma, izuzev u slučaju viskoznog medijuma. U medijumu sa dodatkom HPMC-a uočeno je značajno sporije i nepotpuno rastvaranje paracetamola (oko 30% nakon 1h). S obzirom da se rastvorljivost i difuzitet paracetamola ne menjaju značajno dodatkom HPMC-a (Nelson i Shah, 1987) ovakav rezultat mogao bi se objasniti značajno produženim vremenom raspadanja tableta u viskoznom medijumu.

U aparaturi sa protočnom ćelijom zabeleženo je potpuno rastvaranje paracetamola, ali je brzina rastvaranja značajno manja u poređenju sa aparaturom sa lopaticom te je nakon 30 min rastvoreno oko 65% lekovite supstance pri brzini protoka medijuma od 8 ml/min, odnosno 50% kada je brzina protoka bila 4 ml/min (>85% leka rastvara se tek nakon 45 min). Eksperimentalni uslovi u kojima se koristi manja brzina protoka medijuma (4 ml/min) rezultuju nešto manjom brzinom rastvaranja paracetamola. Ovakvi rezultati reflektuju blagu hidrodinamiku aparature sa protočnom ćelijom u poređenju sa aparaturom sa lopaticom (D'Arcy, 2007; D'Arcy i sar, 2011), kao i činjenicu da je lek u toku prvog sata ispitivanja izložen manjoj zapremini medijuma.

### 4.1.5 *In silico* ispitivanja

#### 4.1.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa

##### Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije paracetamola iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa *Simcyp*® *Population - Based Simulator* (verzija 13.2, Certara™, SAD).

Simulacija apsorpcije sprovedena je korišćenjem fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 7, čije su vrednosti preuzete iz literature ili su *in silico* predviđene. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja paracetamola iz film tableta korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. Validacija modela sprovedena je na osnovu srednjeg profila koncentracije paracetamola u plazmi iz studije Portolés i sar. (2003).

Tabela 7. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije paracetamola

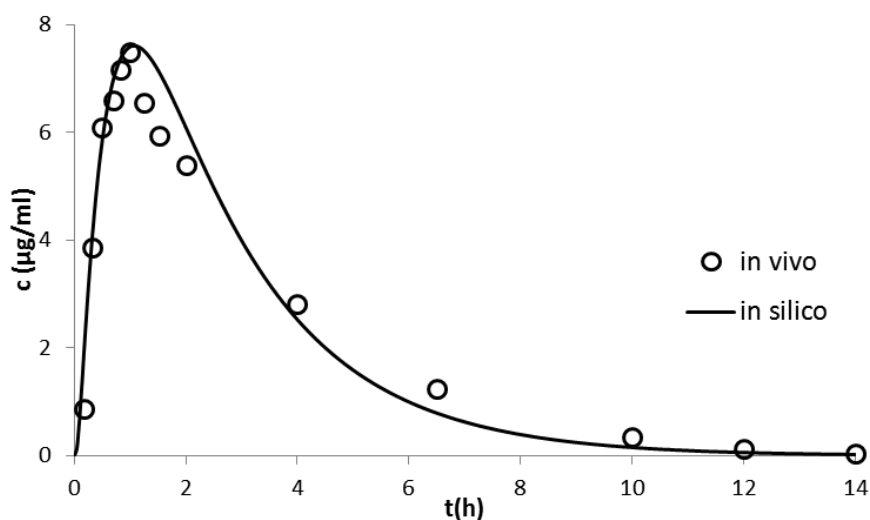
<b>Parametar</b> (jedinica mere)	<b>Vrednost</b>
Molekulska masa (g/mol)	151,17
logP <sub>o:w</sub>	0,2 <sup>a</sup>
Jednobazna kiselina	
pKa	9,5 <sup>b</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>c</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub>	0,70 <sup>d</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, P <sub>eff</sub> (cm/s)	4,8 · 10 <sup>-4</sup> <sup>e</sup>
Rastvorljivost (mg/ml)	23,7 na pH 5,8 <sup>f</sup>
Konstanta precipitacije (h <sup>-1</sup> )	4 <sup>g</sup>
Radius čestica lekovite supstance (μm)	10 <sup>g</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>g</sup>
Distribucija	
Potpuni PBPK model, metoda 1	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, V <sub>ss</sub> (L/kg)	0,601 <sup>h</sup>
Eliminacija	
CL <sub>po</sub> (L/h)	21,0 <sup>i</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	500
Vreme simulacije (h)	14
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250

<sup>a</sup>Podatak iz literature (Poelma i sar, 1991); <sup>b</sup> Podatak iz literature (Vozech i sar, 1988); <sup>c</sup> Podatak iz literature (Forrest i sar, 1982); <sup>d</sup> Podatak iz literature (Morris i Levy, 1984); <sup>e</sup> Podatak iz literature (Gramatté i Richter, 1994); <sup>f</sup> Podatak iz literature (Etman i Naggar, 1990); <sup>g</sup> Simcyp<sup>®</sup> vrednost; <sup>h</sup> Vrednost izračunata u Simcyp<sup>®</sup>-u korišćenjem potpunog PBPK modela distribucije; <sup>i</sup> Podatak iz literature (Prescott, 1996)

Apsorpcija paracetamola iz GI trakta simulirana je korišćenjem ADAM modela. U simulacijama su korišćeni podaci o regionalnoj efektivnoj permeabilnosti paracetamola (u jejunumu 4,8 · 10<sup>-4</sup> cm/s i u ileumu 7,1 · 10<sup>-4</sup> cm/s) iz studije Gramatté i Richter (1994), dok je vrednost efektivne permeabilnosti u kolonu optimizovana korišćenjem *Simcyp<sup>®</sup> Parameter Estimation* opcije kako bi se postiglo najmanje odstupanje simuliranog u odnosu na *in vivo* uočeni profil apsorpcije. Podatak o rastvorljivosti na pH 5,8 preuzet je iz ispitivanja Etman i Naggar (1990). Volumen distribucije predviđen je u Simcyp<sup>®</sup>-u na osnovu potpunog PBPK modela distribucije i metode Poulin i Theil (metoda 1) i iznosi 0,601 L/kg što je u saglasnosti sa literarnim podacima (Rumack, 2004; Zapatar i sar, 2004). Vrednost slobodne frakcije lekovite supstance u plazmi preuzeta je iz studije Morris i Levy (1984). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

Simulirani profil koncentracije paracetamola u plazmi na osnovu ulaznih parametara prikazanih u tabeli 7 u saglasnosti je sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Portolés i sar,

2003) što je prikazano na slici 15, a potvrđeno izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), prikazanih u tabeli 8.



Slika 15. Simulirani profil koncentracije paracetamola u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na *in vivo* profil

Tabela 8. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih greški predviđanja

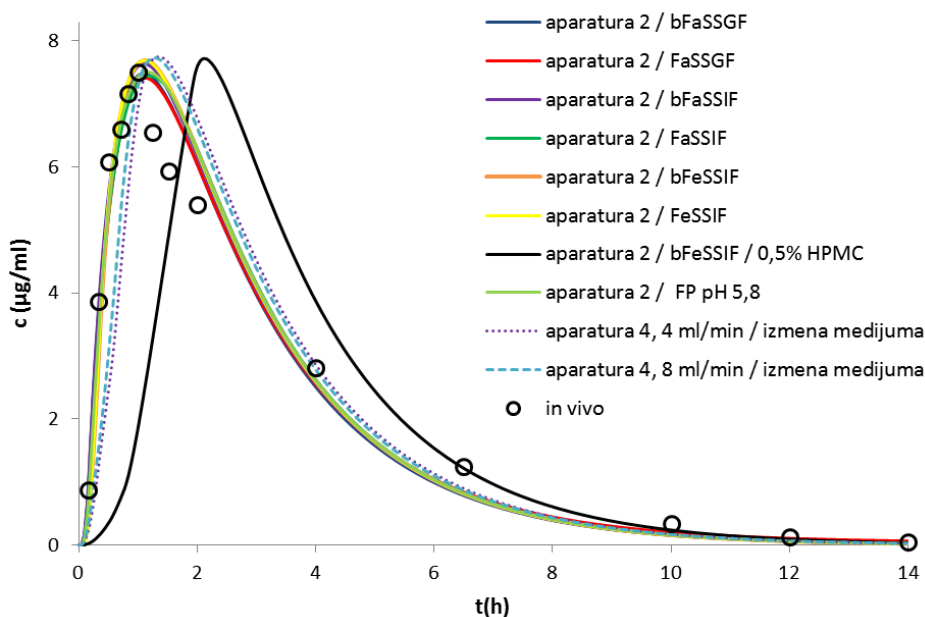
Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{max}$ (µg/ml)	7,50	7,61	1,46
$t_{max}$ (h)	1,00	1,07	7,00
$PIK_{0-t}$ (µgh/ml)	26,90	25,70	4,46

S obzirom da izračunate vrednosti procenta greške predviđanja ne prelaze 10%, model se smatra validiranim i kao takav korišćen je za dalja *in silico* ispitivanja.

### Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Da bi se ispitaio uticaj *in vitro* brzine rastvaranja na profil koncentracije paracetamola u plazmi u funkciji vremena, eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja paracetamola iz film tableta korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije. Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 16, a simulirane vrednosti relevantnih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 9.

Rezultati simulacija ukazuju da *in vitro* profil brzine rastvaranja paracetamola iz tableta nema značajnog uticaja na profil koncentracije leka u plazmi ukoliko je rastvaranje paracetamola potpuno u toku 1 h, čak i u slučaju značajno sporijeg rastvaranja koje je zabeleženo u uređaju tipa protočne ćelije. Simulirani profil koncentracije paracetamola u plazmi kada je kao ulazni parametar korišćen *in vitro* profil brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje viskoznog medijuma ukazuje na značajno produženu apsorpciju uz isti obim apsorpcije (slične vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$  uz značajno višu vrednost  $t_{max}$ ). Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa zapažanjima Parojčić i sar. (2008), kao i *in vivo* ispitivanjima uticaja hrane na farmakokinetiku paracetamola (Souliman i sar, 2006).



Slika 16. Simcyp® simulirani profili koncentracije paracetamola u plazmi i *in vivo* uočeni profil

Tabela 9. Simcyp® predviđeni farmakokinetički parametri i odgovarajuće greške predviđanja

<i>In vitro</i> uslovi ispitivanja		$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	%PE	$t_{max}$ (h)	%PE	$PIK_{0-t}$ ( $\mu\text{gh/ml}$ )	%PE
Aparatura 2 (50 o/min)	bFaSSGF	7,48	0,26	1,12	12,00	25,16	6,47
	FaSSGF	7,41	1,20	1,12	12,00	25,74	4,31
	bFaSSIF	7,63	1,73	1,12	12,00	25,69	4,49
	FaSSIF	7,44	0,80	1,21	21,00	25,69	4,49
	bFeSSIF	7,69	2,53	1,12	12,00	25,69	4,49
	FeSSIF	7,69	2,53	1,12	12,00	25,69	4,49
	bFeSSIF/0,5% HPMC	7,72	2,93	2,21	121,00	25,68	4,53
	FP pH 5,8	7,51	0,13	1,16	16,00	25,69	4,49
Aparatura 4	4 ml/min, izmena medijuma	7,75	3,33	1,35	35,00	25,68	4,53
	8 ml/min, izmena medijuma	7,73	3,07	1,26	26,00	25,69	4,49
<i>In vivo</i>		<b>7,50</b>	/	<b>1,00</b>	/	<b>26,90</b>	/

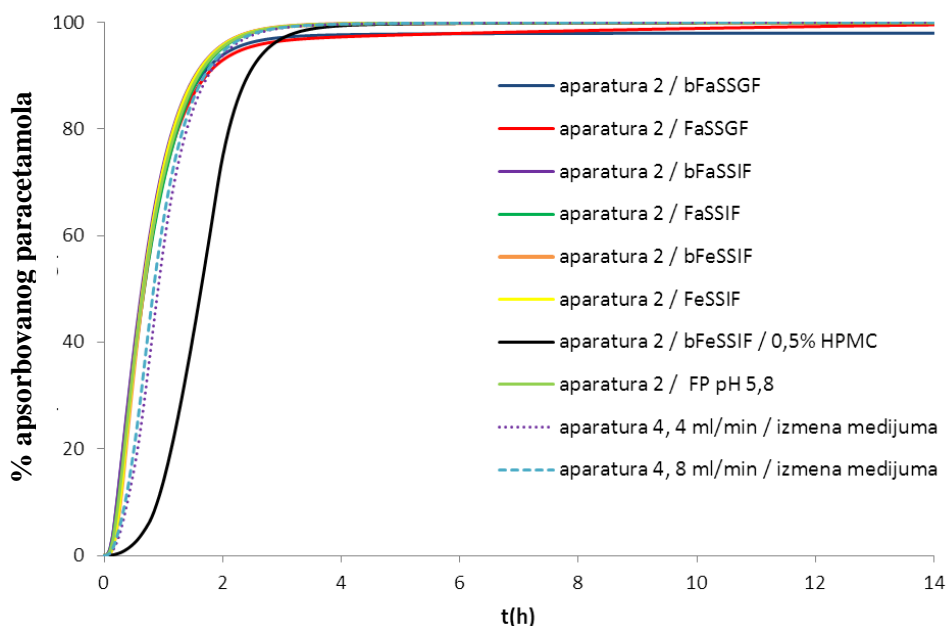
### Identifikacija profila apsorpcije paracetamola primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija apsorpcije paracetamola nakon primene film tableta sa trenutnim oslobađanjem sprovedena je korišćenjem prethodno razvijenog i validiranog modela GI simulacije. Cilj ovih simulacija je procena mogućnosti primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila, kao i uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa.

*In silico* profili apsorpcije paracetamola dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 17. Može se uočiti da apsorpcija paracetamola prati rastvaranje paracetamola, te u slučajevima kada je zabeleženo potpuno rastvaranje paracetamola nakon 1 h, paracetamol se potpuno apsorbuje nakon 1h, što je u saglasnosti sa visokom permeabilnošću lekovite supstance. Apсорpcija paracetamola u slučaju kada je korišćen *in vitro* profil brzine rastvaranja u viskoznom medijumu odvija se nešto sporije. U svim simulacijama predviđeni obim apsorpcije iznosi 100%. Ovakvi rezultati nisu u saglasnosti su literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti paracetamola iz tableta s obzirom



da prilikom izgradnje modela nije uzet u obzir uticaj presistenskog metabolizma u crevima na količinu leka koja dospeva u sistemsku cirkulaciju i koji u ovom slučaju iznosi 10-30% (Clements i sar, 1984; Perucca i Richens, 1979).

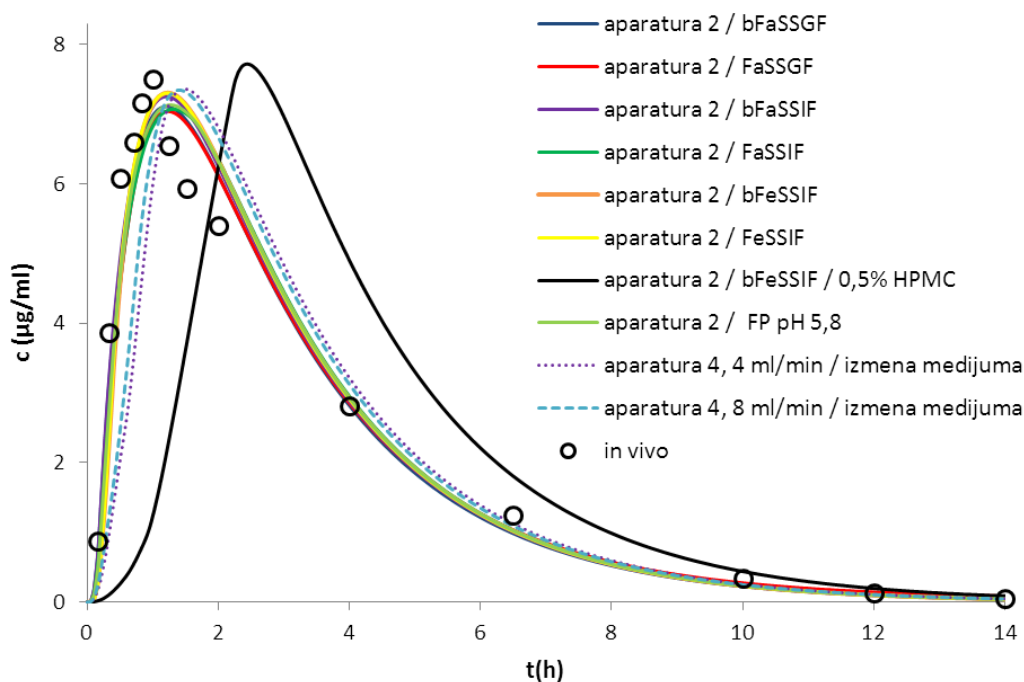


Slika 17. Simcyp® simulirani profili apsorpcije paracetamola na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz film tableta

#### 4.1.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja, vrednosti ulaznih parametara prikazane u tabeli 7 primenjene su s ciljem sprovođenja GI simulacije u okviru komercijalno dostupnog programskog paketa GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD). Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija, izuzev ASF faktora koji je optimizovan kako bi se postiglo najmanje odstupanje simuliranog u odnosu na *in vivo* uočeni profil apsorpcije, i iznosi 1,7 u svim segmentima GI trakta. Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode Poulin i Theil kao i u slučaju Simcyp®-a, i dobijena je vrednost od 0,578 L/kg što odgovara vrednosti predviđenoj u Simcyp®-u (0,601 L/kg).

Simulirani profili koncentracije paracetamola u plazmi dobijeni GI simulacijom u GastroPlus®-u na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz film tableta pod različitim eksperimentalnim uslovima prikazani su na slici 18. Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), dobijenih na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja paracetamola iz tableta u GastroPlus™-u, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 10. U poređenju sa Simcyp® simulacijama dobijene su nešto niže vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ , dok su vrednosti  $t_{max}$  nešto veće. Može se uočiti da su dobijene nešto veće greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara u poređenju sa Simcyp® predviđanjima. GI simulacija u GastroPlus™ programskom paketu takođe je potvrdila neznan uticaj *in vitro* profila brzine rastvaranja na simulirani profil koncentracije paracetamola u plazmi ukoliko je rastvaranje paracetamola potpuno u toku 1 h, kao i negativan uticaj povećanog viskoziteta na brzinu apsorpcije.



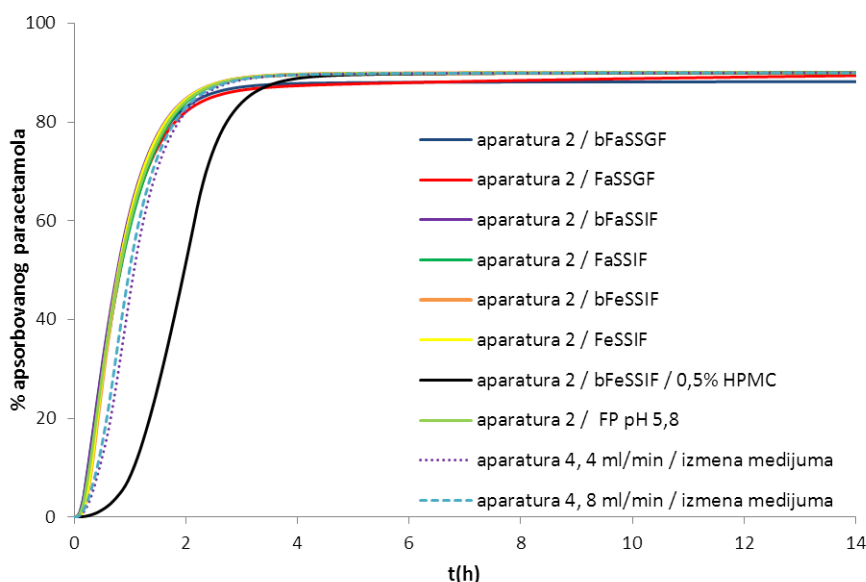
Slika 18. GastroPlus™ simulirani profili koncentracije paracetamola u plazmi i *in vivo* uočeni profil

Tabela 10. GastroPlus™ predviđeni farmakokinetički parametri i odgovarajuće greške predviđanja

<i>In vitro</i> uslovi ispitivanja		$C_{max}$ (µg/ml)	%PE	$t_{max}$ (h)	%PE	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml)	%PE
Aparatura 2 (50 o/min)	bFaSSGF	7,12	5,07	1,32	32,0	24,53	8,81
	FaSSGF	7,10	5,33	1,32	32,0	24,42	9,21
	bFaSSIF	7,20	4,00	1,32	32,0	24,38	9,36
	FaSSIF	7,11	5,20	1,36	36,0	24,52	8,84
	bFeSSIF	7,25	3,33	1,22	22,0	24,52	8,84
	FeSSIF	7,25	3,33	1,25	25,0	24,36	9,44
	bFeSSIF/0,5% HPMC	7,30	2,67	2,50	150,0	24,79	7,84
	FP pH 5,8	7,20	4,00	1,20	20,0	24,28	9,73
Aparatura 4	4 ml/min, izmena medijuma	7,35	2,00	1,32	32,0	24,32	9,59
	8 ml/min, izmena medijuma	7,34	2,13	1,35	35,0	24,12	10,33
<b><i>In vivo</i></b>		<b>7,50</b>	<b>/</b>	<b>1,00</b>	<b>/</b>	<b>26,90</b>	<b>/</b>

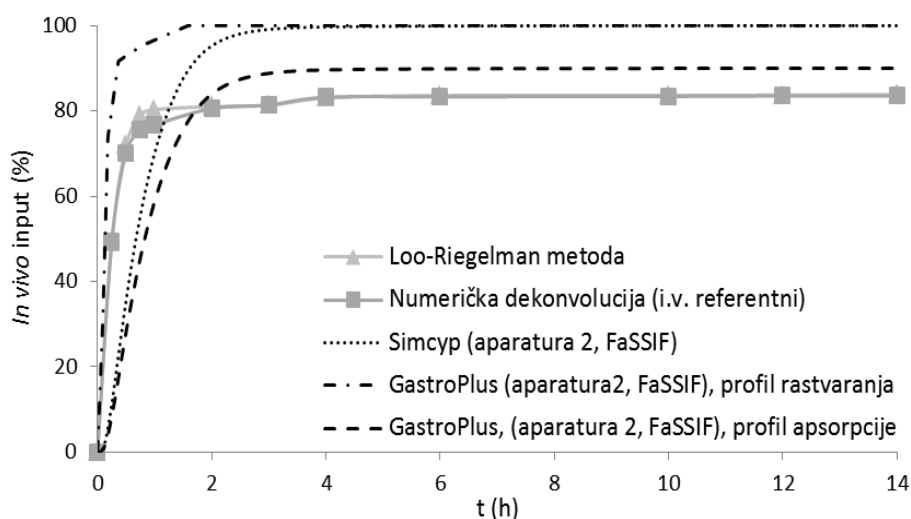
### Identifikacija profila apsorpcije paracetamola primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

U ovoj fazi ispitana je mogućnost primene GI simulacije u GastroPlus™-u za identifikaciju *in vivo* inputa, koji će se potom koristiti za uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom u Simcyp®-u, kao i za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije. Na slici 19 prikazani su simulirani profili apsorpcije paracetamola iz tableta. Predviđeni obim apsorpcije paracetamola od oko 87% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti paracetamola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.



Slika 19. Simulirani profili apsorpcije paracetamola nakon primene film tableta dobijeni GastroPlus™ GI simulacijom

Uporednom analizom može se uočiti da je primenom GastroPlus™ predviđena nešto sporija apsorpcija paracetamola, kao i nešto manji obim apsorpcije u odnosu na Simcyp® simulaciju. Iako su dobijene nešto veće greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara postignuto je značajno bolje predviđanje obima apsorpcije korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa. Dobijeni rezultati mogli bi se objasniti uticajem ASF faktora u okviru ACAT modela, koji je omogućio da prilikom predviđanja količine leka koji dospeva u sistemsku cirkulaciju bude uračunat i presistemski metabolizam u crevima. Naime, ASF faktor predstavlja faktor kojim se u okviru ACAT modela množi vrednost efektivne permeabilnosti kako bi se u obzir uzele varijacije usled metabolizma u crevima, delovanja efluks i influks transportera, različitih pH vrednosti i drugih parametara koji mogu uticati na apsorpciju leka (GastroPlus™ User Manual v 8.0).



Slika 20. *In vivo* input profili paracetamola dobijenih primenom različitih metoda dekonvolucije

Uporedni pregled *in vivo* input profila dobijenih primenom različitih metoda prikazani su na slici 20. GI simulacijom u Simcyp®-u dobijeni su hipotetički profili apsorpcije paracetamola

*in vivo*, dok su u GastroPlus™-u dobijeni profili apsorpcije i rastvaranja paracetamola. Hipotetički profili apsorpcije paracetamola dobijeni GI simulacijom u Simcyp®-u pokazuju nešto sporiju apsorpciju, ali veći obim apsorpcije u poređenju sa profilima apsorpcije izračunatim Loo-Riegelman metodom i numeričkom dekonvolucijom u odnosu na i.v. profil kao referentni, dok je korišćenjem istih *in vitro* profila u GastroPlus™-u predviđena sporija apsorpcija. Na slici 20 su radi preglednosti prikazani samo profili dobijeni GI simulacijom na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja paracetamola u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FaSSIF-a kao medijuma.

#### 4.1.6 *In vitro-in vivo* korelacija

##### Dekonvolucioni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati primenom različitih metoda analizirani su u odnosu na *in vitro* profile brzine rastvaranja paracetamola iz tableta uočene pod različitim eksperimentalnim uslovima.

S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale (TS). Hipotetički input profili dobijeni primenom različitih metoda, kao i eksperimentalni profili brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem paracetamola fitovani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Faktori skaliranja vremenske ose izračunati su kao odnos  $\tau_{d\text{vivo}}$  i  $\tau_{d\text{vitro}}$  (tabela 11). Može se uočiti da se vrednosti faktora TS značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene dekonvolucione metode, kao i *in vitro* profila brzine rastvaranja i kreću se u opsegu 0,17 do 9,40.

Tabela 11. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja paracetamola iz tableta i odgovarajuće vrednosti TS

<i>In vitro</i> profil		TS					
Uređaj	Medijum/ protok	$\tau_a$ (h)	$\beta$	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
<b>Aparatura 2</b> <b>(50 o/min)</b>	bFaSSGF	0,10	2,30	2,70	2,60	8,70	9,40
	FaSSGF	0,12	1,92	2,25	2,25	7,25	7,83
	bFaSSIF	0,10	2,25	2,70	2,60	8,70	9,40
	FaSSIF	0,13	1,93	2,07	2,00	6,69	7,23
	bFeSSIF	0,20	2,18	1,35	1,30	4,35	4,70
	FeSSIF	0,18	2,76	1,50	1,73	4,83	5,22
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,47	2,35	0,18	0,17	0,59	0,64
	FP pH 5,8	0,14	2,25	1,92	1,85	6,21	6,71
<b>Aparatura 4</b>	4 ml/min	0,59	1,49	0,45	0,44	1,47	1,59
	8 ml/min	0,75	1,32	0,36	0,34	1,16	1,25

Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom nakon korekcije vremenske ose prikazani su u tabeli 12. Visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisan vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0,95, dobijen je u svim ispitivanim slučajevima osim kada je *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja rađeno u aparaturi sa protočnom ćelijom pri brzini protoka medijuma od 8 ml/min. Najbolja korelacija, odnosno vrednosti nagiba regresione prave približno jedan, kao i visoka vrednost koeficijenta korelacije dobijena je kada su *in vitro* profili brzine rastvaranja poređeni sa *in vivo* profilom dobijenim Simcyp® GI simulacijom. Dobijeni rezultati potvrđuju da se pored konvencionalne farmakokinetičke analize razvijeni *in silico* modeli mogu uspešno koristiti za identifikaciju *in vivo* input profila paracetamola, što predstavlja osnov za razvoj bioprediktivne metode za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja paracetamola, kao i postavljanje klinički relevantnih specifikacija.

Tabela 12. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem paracetamola (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro input/ in vivo input</i>		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uređaj	Medijum/protok					
Aparatura 2 (50 o/min)	bFaSSGF	<b>a</b>	0,8199	0,8159	1,0179	0,9016
		<b>r</b>	0,9879	0,9843	0,9937	0,9930
	FaSSGF	<b>a</b>	0,8314	0,8236	1,0513	0,9332
		<b>r</b>	0,9965	0,9964	0,9958	0,9954
	bFaSSIF	<b>a</b>	0,7955	0,7926	0,9963	0,8842
		<b>r</b>	0,9928	0,9915	0,9940	0,9937
	FaSSIF	<b>a</b>	0,8084	0,8084	1,0148	0,9041
		<b>r</b>	0,9950	0,9971	0,9943	0,9936
	bFeSSIF	<b>a</b>	0,8030	0,7963	0,9643	0,8568
		<b>r</b>	0,9935	0,9884	0,9986	0,9971
	FeSSIF	<b>a</b>	0,7910	0,7740	0,9307	0,8187
		<b>r</b>	0,9895	0,9796	0,9949	0,9919
	bFeSSIF/0,5% HPMC	<b>a</b>	0,8153	0,8133	0,9419	0,8326
		<b>r</b>	0,9909	0,9836	0,9915	0,9922
FP pH 5,8	<b>a</b>	0,8084	0,8061	0,9850	0,8793	
	<b>r</b>	0,9976	0,9976	0,9960	0,9953	
Aparatura 4	4 ml/min, izmena medijuma	<b>a</b>	0,8065	0,7991	1,0436	0,9257
		<b>r</b>	0,9909	0,9856	0,9941	0,9955
	8 ml/min, izmena medijuma	<b>a</b>	0,8123	0,7973	1,0863	0,9779
		<b>r</b>	0,9492	0,9406	0,9421	0,9501

**a** – nagib regresione prave; **r** – koeficijent korelacije

## Konvolucionni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije, profili koncentracije paracetamola u plazmi predviđeni primenom Simcyp® i GastroPlus™ GI simulacije poređeni su sa srednjim farmakokinetičkim profilom uočenim *in vivo* u studiji Portolés i sar. (2003).

Statistički parametri sprovedene linearne regresione analize prikazani su u tabeli 13. Iz podataka prikazanih u tabeli 13 uočava se da je primenom konvolucionog pristupa postignuta značajno bolja korelacija za profile brzine rastvaranja paracetamola u aparaturi sa lopaticom (izuzev kada je korišćen viskozni medijum) u poređenju sa aparaturom sa protočnom ćelijom.

Tabela 13. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem paracetamola (konvolucionni pristup)

<i>In vitro</i> profil		Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
Uređaj	Medijum/protok	a	r	a	r
Aparatura 2	bFaSSGF	0,9900	0,9981	0,9899	0,9978
	FaSSGF	1,0130	0,9993	1,0139	0,9994
	bFaSSIF	0,9711	0,9960	0,9753	0,9982
	FaSSIF	0,9812	0,9976	0,9843	0,9982
	bFeSSIF	0,9629	0,9988	0,9756	0,9965
	FeSSIF	0,9596	0,9987	0,9612	0,9978
	bFeSSIF/0,5% HPMC	0,5799	0,5056	0,5023	0,5014
	FP pH 5,8	0,9838	0,9996	0,9912	0,9997
Aparatura 4	4 ml/min	1,0185	0,9368	1,0173	0,9471
	8 ml/min	1,0125	0,9465	1,0156	0,9489

a – nagib regresione prave; r – koeficijent korelacije

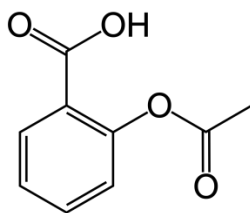
Rezultati sprovedenih ispitivanja pokazuju da je primenom aparature sa lopaticom postignuto veoma brzo rastvaranje paracetamola (>85% rastvoreno je za 15 min) izuzev u slučaju kada je korišćen viskozni medijum. Pokazano je da različite pH vrednosti medijuma u okviru fiziološkog opsega pH vrednosti nemaju značajnog uticaja na brzinu rastvaranja paracetamola, što je u saglasnosti sa pH-nezavisnom rastvorljivošću paracetamola. Dodatak fizioloških surfaktanata takođe nije imao značajnog uticaja na brzinu rastvaranja paracetamola. Dodatak HPMC-a u medijum uslovljava značajno sporije i nepotpuno rastvaranje paracetamola (oko 30% leka rastvoreno je nakon 1h) što bi se moglo pripisati produženom vremenu raspadanja tableta. Blaža hidrodinamika aparature sa protočnom ćelijom uslovljava nešto sporije oslobađanje paracetamola, te je 85% lekovite supstance rastvoreno tek nakon 45 min.

Primenom metodologije GI simulacije korišćenjem Simcyp® i GastroPlus™ programskih paketa bilo je moguće predvideti profil koncentracije paracetamola koji je u skladu sa *in vivo* rezultatima objavljenim u literaturi. Nešto bolje predviđanje obima apsorpcije gastrointestinalnom simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa moglo bi se objasniti uticajem apsorpcionog faktora proporcionalnosti u okviru ACAT modela, koji je omogućio da prilikom predviđanja količine leka koji dospeva u sistemsku cirkulaciju bude uračunat i presistemski metabolizam u crevima. Simulacijama je pokazano da brzina rastvaranja paracetamola iz tableta nema značajnog uticaja na rezultate GI simulacije ukoliko je više od 85% paracetamola rastvoreno nakon 45 min, što bi se moglo usvojiti kao klinički relevantna specifikacija za tablete sa trenutnim oslobađanjem paracetamola.

Procenom mogućnosti uspostavljanja IVIVK primenom dekonvolucionog i konvolucionog pristupa analizi podataka pokazano je da se primenom oba pristupa dolazi do sličnih zaključaka. Potrebno je napomenuti da je, imajući u vidu razlike u vremenu rastvaranja leka *in vitro* i *in vivo*, kod dekonvolucionog pristupa analizi vremensku skalu koja prikazuje *in vitro* podatke bilo potrebno korigovati odgovarajućim faktorom skaliranja vremenske ose kako bi se dobili profili

koji su uporedivi sa *in vivo* podacima. Oba pristupa omogućila su uspostavljanje IVIVK za rezultate ispitivanja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje fiziološki zasnovanih medijuma sa i bez lecitina i tauroholata, kao i fosfatnog pufera pH vrednosti 5,8, odnosno u slučajevima kada je više od 85% lekovite susptance rastvoreno nakon 45 min. S obzirom da nije zabeležen značajan uticaj dodatka lecitina i tauroholata na brzinu rastvaranja paracetamola, a uzimajući u obzir jednostavnost pripreme, analize uzoraka, stabilnost i cenu, aparatura sa lopaticom uz korišćenje bFaSSIF kao medijuma za ispitivanje mogla bi se predložiti kao bioprediktivna metoda za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja paracetamola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.

## 4.2 MODEL SUPSTANCA: ACETILSALICILNA KISELINA



2-acetoksibenzojeva kiselina

Slika 21. Strukturna formula i hemijski naziv acetilsalicilne kiseline

Acetilsalicilna kiselina pripada grupi nesteroidnih antiinflamatornih lekova i deluje kao antikoagulans, fibrinolitik, inhibitor agregacije trombocita i inhibitor ciklooksigenaze. Posедуje analgetička, antiinflamatorna i antipiretska svojstva. Koristi se kod odraslih osoba u tretmanu blagih do umerenih bolova kao što su glavobolja, dismenoreja, mialgija i zubobolja. Acetilsalicilna kiselina se takođe koristi u tretmanu bola i inflamacije kod akutnih ili hroničnih reumatskih bolesti kao što su reumatoidni artritis, juvenilni idiopatski artritis, osteoartritis i ankilozirajući spondilitis. Uobičajna doza za odrasle je 300-900 mg na svakih 4-6 h u skladu sa kliničkim potrebama. Maksimalna dnevna doza je 4 g (Farmakoterapijski vodič, 2022). Detaljan pregled fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i biofarmaceutskih svojstava acetilsalicilne kiseline prikazan je u okviru odgovarajuće FIP Biowaiver monografije (Dressman i sar, 2012).

### 4.2.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva acetilsalicilne kiseline

Particioni koeficijent acetilsalicilne kiseline  $\log P$  iznosi 1,18 (Kasim i sar, 2004). Acetilsalicilna kiselina je slaba kiselina i njena  $pK_a$  vrednost je 3,49 (Law i sar, 2014). Ukoliko bi se razmatrala navedena vrednost  $\log P$  (1,18) koja je manja od vrednosti za metoprolol kao referentnu supstancu ( $\log P$  metoprolola je 1,72) acetilsalicilna kiselina bi se mogla smatrati nisko permeabilnom. Međutim, vrednost  $P_{app}$  određena na Caco-2 ćelijama iznosi  $2,4 \cdot 10^{-6}$  cm/s što je više od granične vrednosti ( $2 \cdot 10^{-6}$  cm/s), te bi se na osnovu ovog parametra mogla svrstati u visoko permeabilne lekovite supstance (Artursson i Karlsson, 1991). Acetilsalicilna kiselina pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost u okviru fiziološkog opsega pH vrednosti (4,70 mg/ml na pH 1,0; 5,00 mg/ml na pH 3,5; 6,62 mg/ml na pH 4,5 i 7,64 mg/ml na pH 6,8) (Dressman i sar, 2012). Podaci o rastvorljivosti acetilsalicilne kiseline ukazuju da se maksimalna pojedinačna doza acetilsalicilne kiseline od 1000 mg može rastvoriti u 250 ml medijuma. Iz navedenog se može zaključiti da acetilsalicilna kiselina spada u klasu 2 BCS.

Nakon oralne primene se oko 10% lekovite supstance apsorbuje u želucu (Cooke i Hunt, 1970), dok se značajno veći procenat apsorbuje u tankom crevu (George, 1981). Needs i Brooks (1985) su pokazali da je glavni put apsorpcije acetilsalicilne kiseline u tankom crevu pasivna difuzija. Apsolutna biološka raspoloživost acetilsalicilne kiseline daleko je od potpune zbog značajnog metabolizma u tankom crevu i jetri (George, 1981). Katalizovana hidroliza acetilsalicilne kiseline moguća je i nakon dospevanja u sistemsku cirkulaciju putem esteraza u plazmi, eritrocitima i sinovijalnoj tečnosti. Ovo je razlog što je u velikom broju studija biološka raspoloživost acetilsalicilne kiseline izražena na osnovu podataka za salicilnu kiselinu (Dressman i sar, 2012). Nakon oralne primene rastvora, maksimalna koncentracija acetilsalicilne kiseline u plazmi postiže se za 20-25 min i vrlo brzo opada, dok koncentracija salicilne kiseline raste (Rowland i sar, 1972). U ovoj studiji istovremeno je praćena koncentracija acetilsalicilne i salicilne kiseline i pokazano je da je 68% acetilsalicilne kiseline dospelo u sistemsku cirkulaciju



u nepromenjenom obliku, dok je ostatak metabolizovan u salicilnu kiselinu (Rowland i sar, 1972). U prilog potpunoj apsorpciji acetilsalicilne kiseline nakon oralne primene govore i studije u kojima je acetilsalicilna kiselina  $^{14}\text{C}$  radioaktivno obeležena. Izlučivanje  $^{14}\text{C}$  urinom bilo je gotovo potpuno (94-98%) nakon 24 h ispitivanja (Hutt i sar, 1982). Acetilsalicilna kiselina se brzo distribuira u periferna tkiva i volumen distribucije iznosi 0,15-0,2 L/kg kod odraslih (Martindale, 2020).

Farmakokinetika acetilsalicilne kiseline je linearna u opsegu doza 30-400 mg. Tek oko 1% biva izlučen putem urina u nepromenjenom obliku. Ostatak se izlučuje putem urina kao salicilna kiselina i njeni metaboliti (Dressman i sar, 2012).

#### 4.2.2 *In vivo* podaci

Detaljnim pregledom *in vivo* studija dostupnih u literaturi za različite farmaceutske oblike acetilsalicilne kiseline, u cilju biofarmaceutske karakterizacije izabrani su literaturni profili koncentracija acetilsalicilne kiseline u plazmi dobijeni nakon primene efervescentne tablete koja je prethodno dispergovana (Sagar i Smyth, 1999) i tablete sa trenutnim oslobađanjem (Voelker i Hammer, 2012).

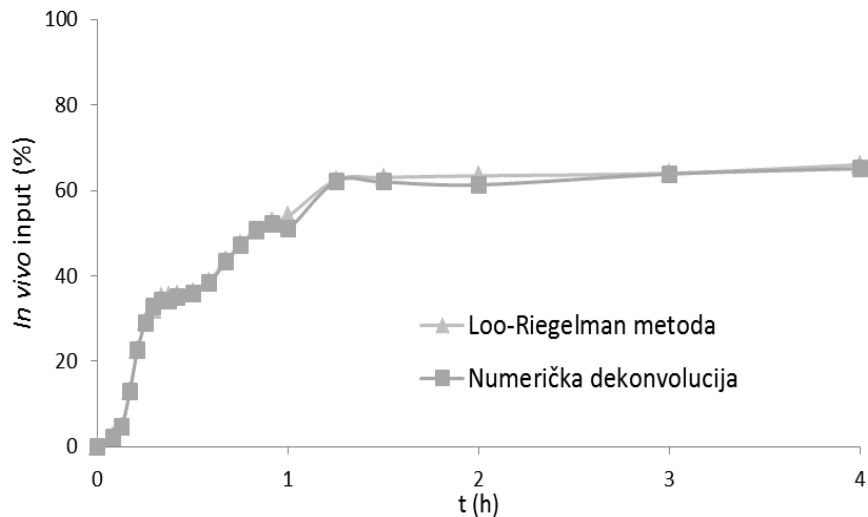
Obe studije obuhvatile se ispitivanje farmakokinetike acetilsalicilne kiseline iz različitih formulacija (efervescentne tablete, tablete sa trenutnim oslobađanjem, tablete koje sadrže mikronizovanu acetilsalicilnu kiselinu, tablete sa produženim oslobađanjem i td.) kojima je pokazano da koncentracija acetilsalicilne kiseline u plazmi zavisi od formulacije, odnosno farmaceutskog oblika leka. Osnovni farmakokinetički parametri uočeni nakon primene izabranih farmaceutskih oblika acetilsalicilne kiseline prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14. Farmakokinetički parametri izabranih preparata acetilsalicilne kiseline

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> ( $\mu\text{gh/ml}$ )	C <sub>max</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	Referenca
Efervescentna tablete (375 mg)	7,12	11,25	0,32	0,33	Sagar i Smyth, 1999
Tablete sa trenutnim oslobađanjem (500 mg)	6,5±1,55	4,4±1,54	2,79±0,55	0,75±0,37	Voelker i Hammer, 2012

#### 4.2.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila acetilsalicilne kiseline dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

Hipotetički *in vivo* input profili acetilsalicilne kiseline izračunati primenom Loo-Riegelman metode i numeričke dekonvolucije, pri čemu je kao referentni (težinska funkcija) korišćen farmakokinetički profil dobijen nakon oralne primene prethodno rastvorene efervescentne tablete prikazani su na slici 22. Može se uočiti da su dobijeni profili gotovo podudarni i pokazuju plato na oko 65 % što odgovara literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti acetilsalicilne kiseline (Rowland i sar, 1972).

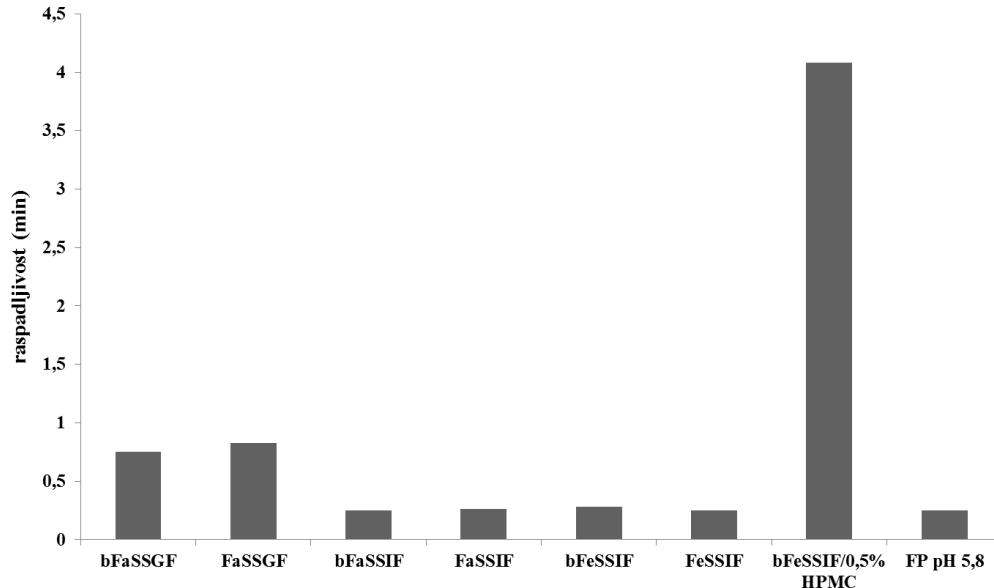


Slika 22. Hipotetički *in vivo* input profili acetilsalicilne kiseline iz tableta izračunati primenom različitih farmakokinetičkih metoda

## 4.2.4 *In vitro* ispitivanja

### Raspaljivost tableta

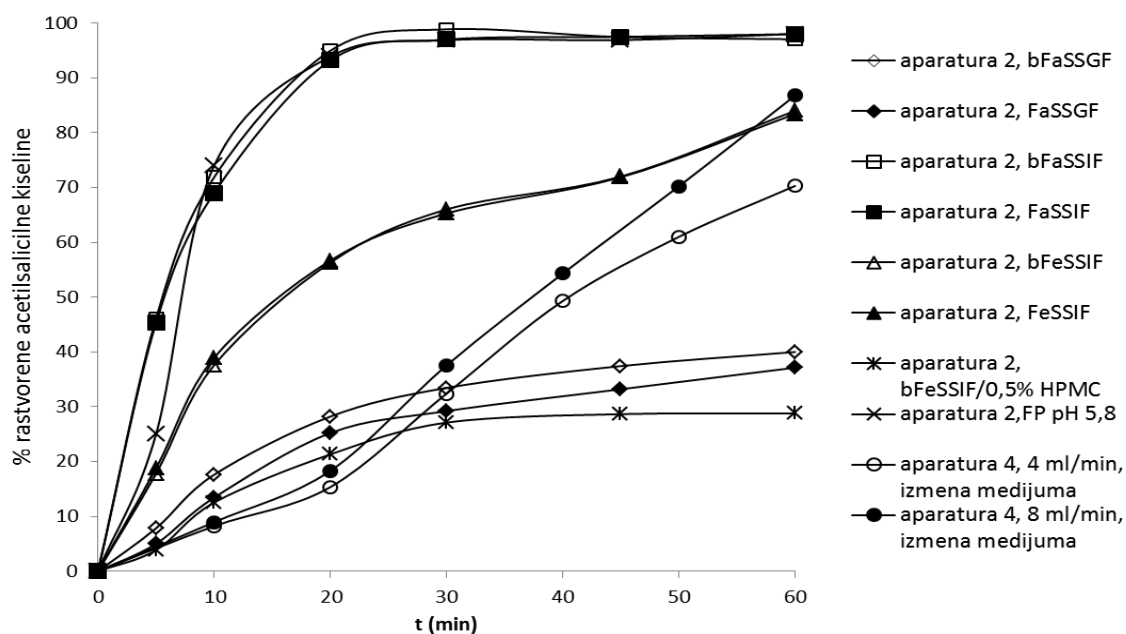
Na slici 23 prikazana su rezultati ispitivanja raspaljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline. Može se uočiti da se tablete u svim ispitivanim medijumima raspadaju veoma brzo, u nevizkoznom medijumima za manje od 1 min, dok je vreme dezintegracije u medijumu koji sadrži 0,5% HPMC-a produženo i iznosi oko 4 minuta.



Slika 23. Raspaljivost tableta acetilsalicilne kiseline u različitim medijumima

### Brzina rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta

Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta sa trenutnim oslobađanjem u aparaturi sa lopaticom u različitim medijumima i aparaturi sa protočnom ćelijom uz korišćenje izabrane izmene medijuma (15 min bFaSSGF / 45 min bFaSSIF) prikazani su na slici 24.



Slika 24. Brzina rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta pri različitim uslovima ispitivanja

Rezultati dobijeni ispitivanjem u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje bFaSSIF, FaSSIF i FP pH 5,8 kao medijuma odgovaraju veoma brzom rastvaranju (nakon 15 min rastvoreno je više od 85% lekovite supstance). Sa smanjenjem pH vrednosti medijuma smanjuje se rastvorljivost acetilsalicilne kiseline, te je u medijumima bFeSSIF (pH 5,0) i FeSSIF (pH 5,0) 85% lekovite supstance rastvoreno tek nakon 60 min ispitivanja. Značajno sporije rastvaranje u aparaturi sa lopaticom zabeleženo je u slučaju medijumima nižih pH vrednosti (bFaSSGF i FaSSGF) gde je nakon 60 min rastvoreno oko 35% lekovite supstance. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa pH-zavisnom rastvorljivošću acetilsalicilne kiseline gde se pri nižim vrednostima pH ona nalazi u nejonizovanom obliku koji pokazuje nižu rastvorljivost dok sa porastom pH vrednosti medijuma iznad pKa vrednosti, acetilsalicilna kiselina prelazi u jonizovani oblik koji pokazuje značajno višu rastvorljivost. Ispitivanje u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje viskoznog medijuma rezultuje sporim i nepotpunim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline iz tableta gde je nakon 30 min ispitivanja dostignut plato od oko 30% rastvorene acetilsalicilne kiseline.

U aparaturi sa protočnom ćelijom zabeleženo je značajno sporije rastvaranje acetilsalicilne kiseline, te je nakon 60 min ispitivanja pri protoku 4 ml/min rastvoreno 70% lekovite supstance odnosno 85% pri protoku 8 ml/min. Eksperimentalni uslovi u kojima se koristi manja brzina protoka medijuma (4 ml/min) rezultuju nešto manjom brzinom rastvaranja acetilsalicilne kiseline. Ovakvi rezultati reflektuju blagu hidrodinamiku aparature sa protočnom ćelijom u poređenju sa aparaturom sa lopaticom (D'Arcy, 2007; D'Arcy i sar, 2011), kao i činjenicu da se pH vrednost pri izmeni medijuma u protočnoj ćeliji postepeno povećava i prelazi pKa vrednost (kada se povećava rastvorljivost acetilsalicilne kiseline) tek nakon izvesnog vremena, kao i da je lekovita supstanca u toku prvog sata ispitivanja izložena manjoj zapremini medijuma u poređenju sa aparaturom sa lopaticom.

#### 4.2.5 *In silico* ispitivanja

U okviru ovog poglavlja biće opisana GI simulacija apsorpcije acetilsalicilne kiseline iz tableta primenom Simcyp<sup>®</sup> i GastroPlus<sup>™</sup> programskih paketa u cilju mehanističke interpretacije apsorpcije acetilsalicilne kiseline, identifikacije bioprediktivne metode i postavljanja klinički relevantnih specifikacija za brzinu rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta.

#### 4.2.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa

##### Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije acetilsalicilne kiseline iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa *Simcyp® Population - Based Simulator* (verzija 13.2, Certara™, SAD). Simulacija apsorpcije sprovedena je korišćenjem fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 15, čije su vrednosti preuzete iz literature i/ili su *in silico* predviđene. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. Validacija modela sprovedena je na osnovu srednjeg profila koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi iz studije Voelker i Hammer (2012).

Tabela 15. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije acetilsalicilne kiseline

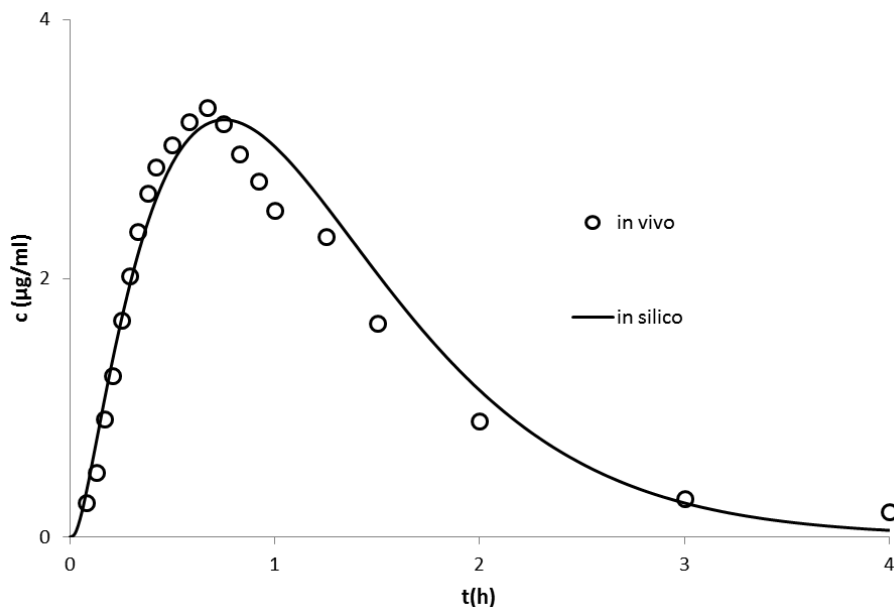
Parametar (jedinica mere)	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	180,157
logP <sub>o:w</sub>	1,18 <sup>a</sup>
Jednobazna kiselina	
pKa	3,5 <sup>a</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>b</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub>	0,417 <sup>c</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, P <sub>eff</sub> (cm/s)	4,2 · 10 <sup>-4</sup> d
pH-zavisna rastvorljivost (mg/ml)	4,70 na pH 1,0 <sup>e</sup> 5,00 na pH 3,5 <sup>e</sup> 6,62 na pH 4,5 <sup>e</sup> 7,64 na pH 6,8 <sup>e</sup>
Konstanta precipitacije (h <sup>-1</sup> )	4 <sup>b</sup>
Radius čestica lekovite supstance (μm)	10 <sup>b</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>b</sup>
Distribucija	
Potpuni PBPK model, metoda 2	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, V <sub>ss</sub> (L/kg)	0,1997 <sup>f</sup>
Eliminacija	
CL <sub>po</sub> (L/h)	97,7 <sup>g</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	500
Vreme simulacije (h)	4
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250

<sup>a</sup> Podatak iz literature (Kasim i sar, 2004); <sup>b</sup> Simcyp® osnovna vrednost; <sup>c</sup> Podatak iz literature (Ghahramani i sar, 1998); <sup>d</sup> Videti tekst; <sup>e</sup> Podatak iz literature (Dressman i sar, 2012); <sup>f</sup> Vrednost izračunata u Simcyp®-u korišćenjem potpunog PBPK modela distribucije; <sup>g</sup> Podatak iz literature (Nagelschmitz i sar, 2014)

Apsorpcija acetilsalicilne kiseline iz GI trakta simulirana je korišćenjem ADAM modela. U simulacijama je korišćena vrednost efektivne permeabilnosti acetilsalicilne kiseline od 4,2 · 10<sup>-4</sup> cm/s izračunata na osnovu vrednosti određene na Caco-2 ćelijama iz studije Artursson i Karlsson (1991), dok je vrednost efektivne permeabilnosti u duodenumu optimizovana korišćenjem *Simcyp® Parameter Estimation* opcije i iznosi 9,0 · 10<sup>-4</sup> cm/s. U simulacijama je korišćen pH-zavisni profil rastvorljivosti iz studije Dressman i sar. (2012). Volumen distribucije predviđen je u Simcyp®-u na osnovu potpunog PBPK modela distribucije i metode Rodgers i Rowland (metoda 2) i iznosi 0,1997 L/kg što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Martindale, 2020).

Vrednost slobodne frakcije lekovite supstance u plazmi preuzeta je iz studije Ghahramani i sar (1998). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

Simulirani profil koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi na osnovu ulaznih parametara prikazanih u tabeli 15 u saglasnosti je sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Voelker i Hammer, 2012) što je prikazano na slici 25, a potvrđeno izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), prikazanih u tabeli 16.



Slika 25. Simulirani profil koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na *in vivo* zabeleženi profil

Može se uočiti da je najveća vrednost greške predviđanja dobijena za vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi,  $t_{max}$  (13,43%). No, imajući u vidu da je ova greška procenjena u odnosu na srednju vrednost  $t_{max}$  za veći broj pojedinaca između kojih postoje manje ili veće interindividualne varijacije, kao i da se predviđena vrednost za  $t_{max}$  nakon oralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline nalazi u opsegu dokumentovanih vrednosti, simulirana vrednost od 0,67 h se može smatrati prihvatljivom, a model validiranim i kao takav biće korišćen u daljem ispitivanju.

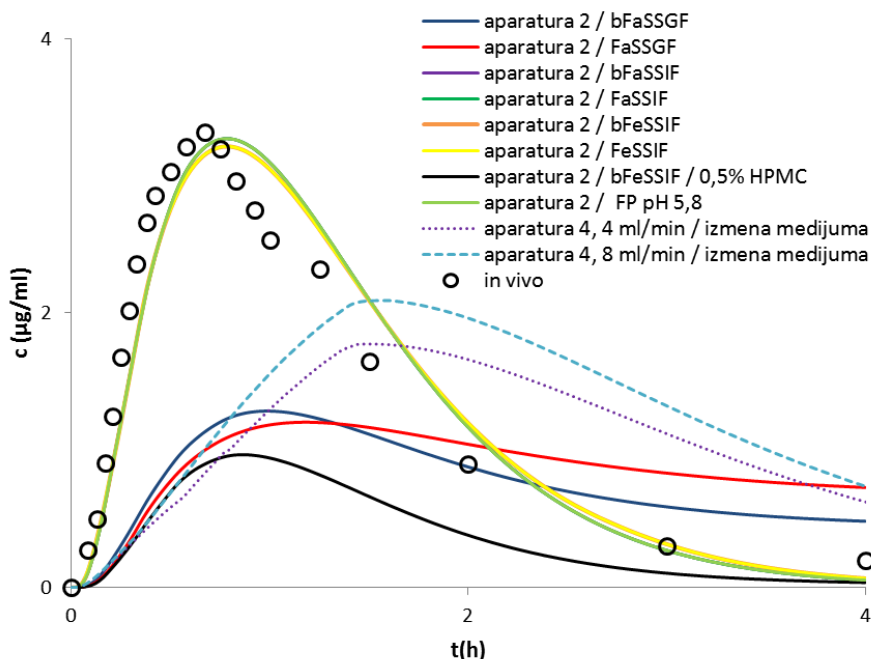
Tabela 16. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih vrednosti greške predviđanja za tablete sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline

Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{max}$ (µg/ml)	3,32	3,23	2,71
$t_{max}$ (h)	0,67	0,76	13,43
$PIK_{0-t}$ (µgh/ml)	5,32	5,14	3,38

### Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Da bi se ispitaio uticaj *in vitro* brzine rastvaranja na profil koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi u funkciji vremena, eksperimentalno dobijeni *in vitro* profili brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćeni su kao ulazni podaci za

simulacije. Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 26, a dobijene vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 17.



Slika 26. Simulirani profili koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja zajedno sa *in vivo* uočenim profilom

Najbolje slaganje simuliranih i *in vivo* zabeleženih profila koncentracije leka u plazmi uočeno je za profil brzine rastvaranja dobijene u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje bFaSSIF, FaSSIF, bFeSSIF, FeSSIF i FP pH 5,8. Ovakvi rezultati simulacija ukazuju da *in vitro* profil brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta sa trenutnim oslobađanjem nema značajnog uticaja na profil koncentracije leka u plazmi ukoliko je 65% acetilsalicilne kiseline rastvoreno nakon 30 min ispitivanja, čak i u slučaju značajno sporijeg oslobađanja koje je zabeleženo pri korišćenju bFeSSIF odnosno FeSSIF medijuma u aparaturi sa lopaticom. Dobijeni rezultati ukazuju da se acetilsalicilna kiselina dominantno apsorbuje u proksimalnom delu tankog creva što je u saglasnosti sa literaturnim podacima da je apsorpcija acetilsalicilne kiseline značajno brža u proksimalnom u poređenju sa distalnim delom tankog creva (Dietzel i sar, 2012).

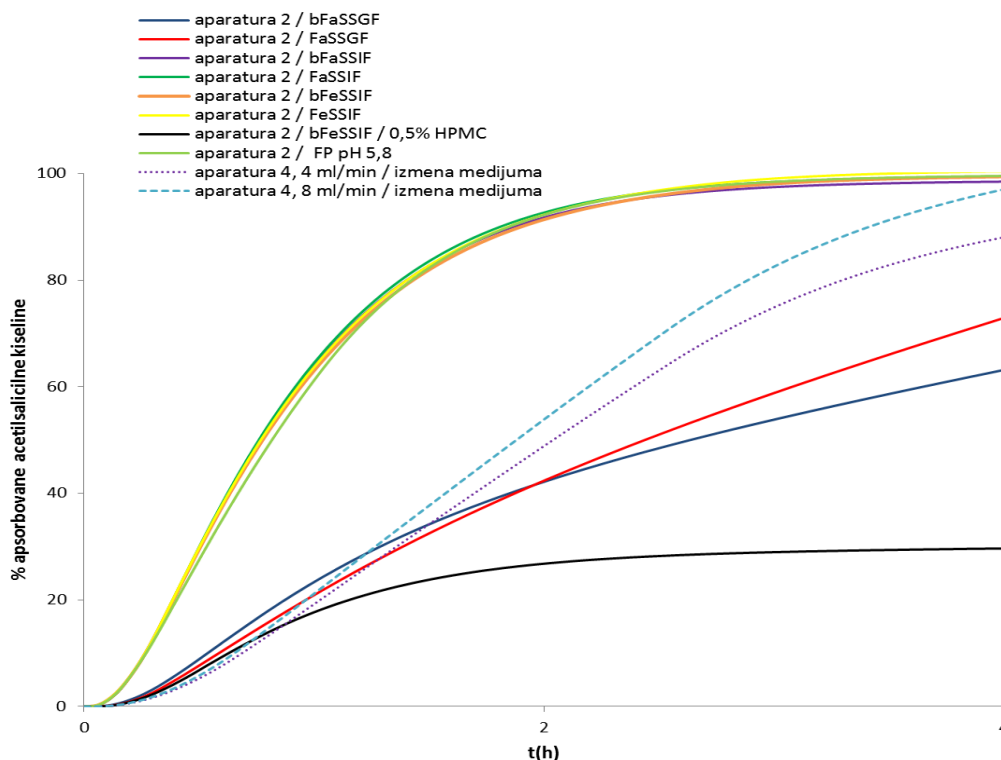
Tabela 17. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta i odgovarajuće vrednosti greške predviđanja

<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
Aparatura 2	bFaSSGF	1,29	61,1	0,98	46,3	3,10	41,7
	FaSSGF	1,20	63,8	1,18	76,1	3,52	33,8
	bFaSSIF	3,20	3,6	0,78	16,4	5,08	4,5
	FaSSIF	3,27	1,5	0,78	16,4	5,11	3,9
	bFeSSIF	3,19	3,9	0,78	16,4	5,08	4,5
	FeSSIF	3,18	4,2	0,78	16,4	5,09	4,3
	bFeSSIF/0,5% HPMC	0,97	70,7	0,86	28,3	1,52	71,4
	FP pH 5,8	3,12	6,0	0,80	19,4	5,14	3,4
Aparatura 4	4 ml/min	2,14	35,5	1,38	105,9	4,27	19,7
	8 ml/min	1,86	43,9	1,40	108,9	4,78	10,1
<i>In vivo</i>		<b>3,32</b>		<b>0,67</b>		<b>5,32</b>	

## Identifikacija profila apsorpcije acetilsalicilne kiseline primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija procesa apsorpcije acetilsalicilne kiseline iz tableta sprovedena je korišćenjem prethodno razvijenog i validiranog modela gastrointestinalne simulacije. Cilj ovih simulacija je procena mogućnosti primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila, kao i uporedna analiza sa rezultatima dobijenih primenom različitih pristupa.

*In silico* profili apsorpcije acetilsalicilne kiseline iz tableta dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 27. Može se uočiti da je u slučajevima kada je više od 65% lekovite supstance rastvoreno nakon 30 min ispitivanja, apsorpcija acetilsalicilne kiseline brza i potpuna. Predviđeni obim apsorpcije od 100% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o potpunoj apsorpciji acetilsalicilne kiseline iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Hutt i sar, 1982) i ukazuju da model dobro simulira apsorpciju acetilsalicilne kiseline iz gastrointestinalnog trakta.

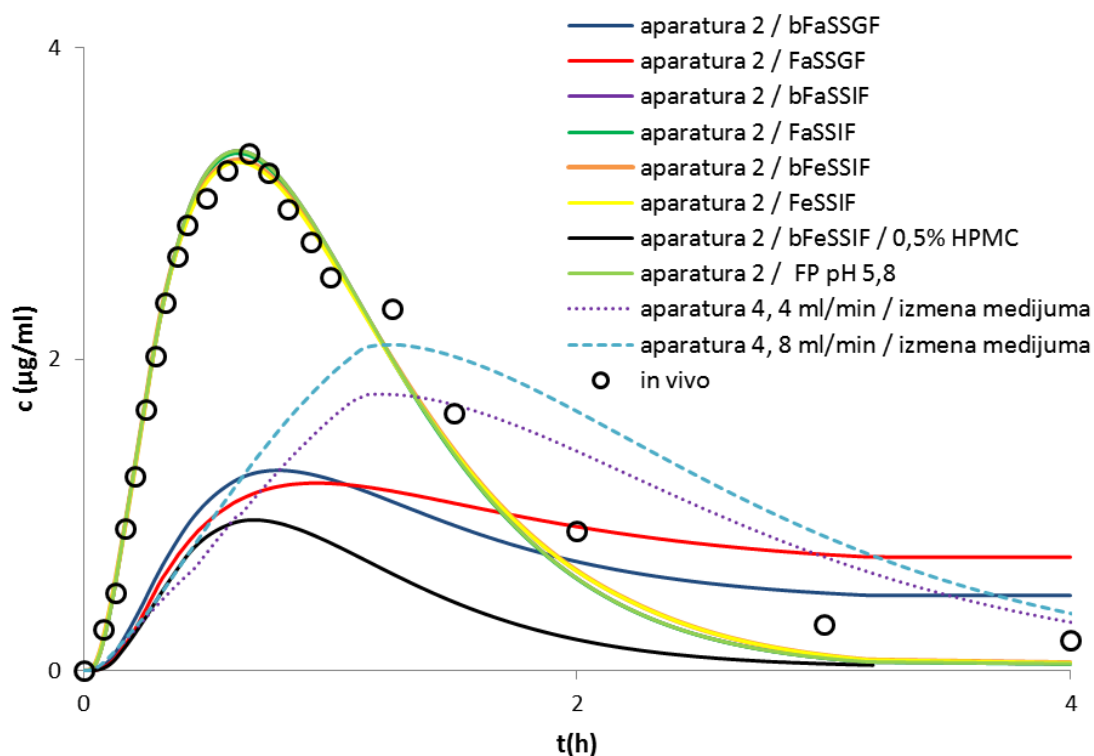


Slika 27. Simulirani *in vivo* profili apsorpcije acetilsalicilne kiseline na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja

### 4.2.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja vrednosti ulaznih parametara prikazane u tabeli 15 korišćene su u okviru komercijalno dostupnog GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) programskog paketa sa ciljem da se identifikuju hipotetički *in vivo* input profili za uspostavljanje IVIVK. Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija, izuzev vrednosti ASF faktora koje su optimizovane tako da simulirani profil koncentracije leka u plazmi što manje odstupa od *in vivo* uočenih vrednosti. Svi ostali parametri koji opisuju fiziologiju humanog GIT-a na gladno zadržani su na GastroPlus™ preporučenim vrednostima. Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode metode Rodgers i Rowland kao i u slučaju Simcyp®-a, i dobijena je vrednost od

0,189 L/kg što odgovara vrednosti predviđenoj u Simcyp®-u, kao i literaturnim podacima o *in vivo* volumenu distribucije.



Slika 28. Simulirani profili koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi dobijeni GastroPlus™ GI simulacijom na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja i profil uočen *in vivo*

Tabela 18. Farmakokinetički parametri predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta i odgovarajuće greške predviđanja

<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	PIK <sub>0-t</sub>	%PE
Uređaj	Medijum/protok	(µg/ml)		(h)		(µgh/ml)	
Aparatura 2	bFaSSGF	1,35	59,3	0,82	22,3	2,99	43,7
	FaSSGF	1,32	60,2	0,91	35,8	3,45	35,1
	bFaSSIF	3,31	0,3	0,66	1,49	5,10	4,1
	FaSSIF	3,30	0,6	0,66	1,49	5,09	4,3
	bFeSSIF	3,29	0,9	0,66	1,49	5,07	4,6
	FeSSIF	3,30	0,6	0,66	1,49	5,10	4,1
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,05	68,3	0,80	19,4	1,47	72,3
	FP 5,8	3,29	0,9	0,66	1,49	5,05	5,0
Aparatura 4	4 ml/min	2,32	30,1	1,23	83,5	4,15	21,9
	8 ml/min	1,93	41,8	1,25	86,5	4,70	11,6
<b><i>In vivo</i></b>		<b>3,32</b>		<b>0,67</b>		<b>5,32</b>	

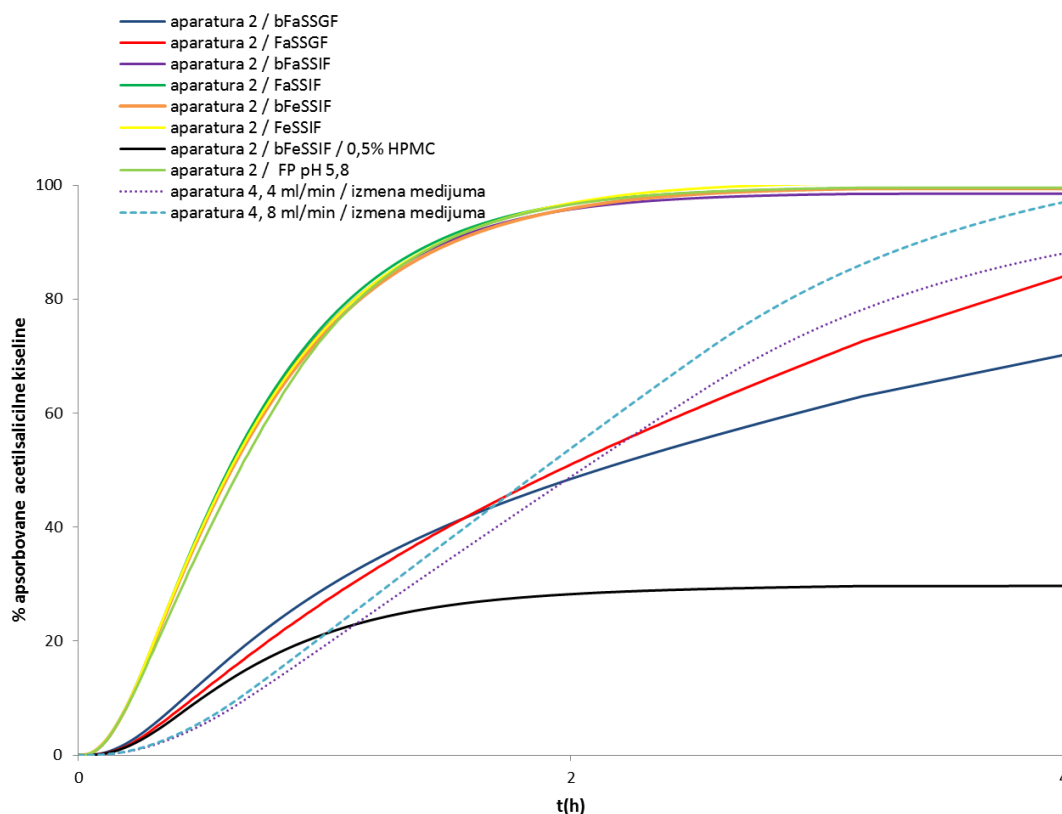
U slučaju korišćenja eksperimentalnih *in vitro* profila dobijenih u aparaturi sa lopaticom i medijumima bFaSSIF, FaSSIF, bFeSSIF, FeSSIF i FP pH 5,8 kao ulaznih parametara dobijene su niske vrednosti greški predviđanja osnovnih farmakokinetičkih parametara (tabela 18). Na osnovu prikazanih podataka (slika 28) se vidi da se najveće odstupanje između simuliranih i *in vivo* uočenih vrednosti javlja u fazi eliminacije leka, dok se vrednosti koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi u fazi apsorpcije leka međusobno odlično slažu.



## Identifikacija profila apsorpcije acetilsalicilne kiseline primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

U ovoj fazi ispitana je mogućnost primene GI simulacije u GastroPlus™-u za identifikaciju *in vivo* inputa, koji će se potom koristiti za uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom u Simcyp®-u, kao i za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije.

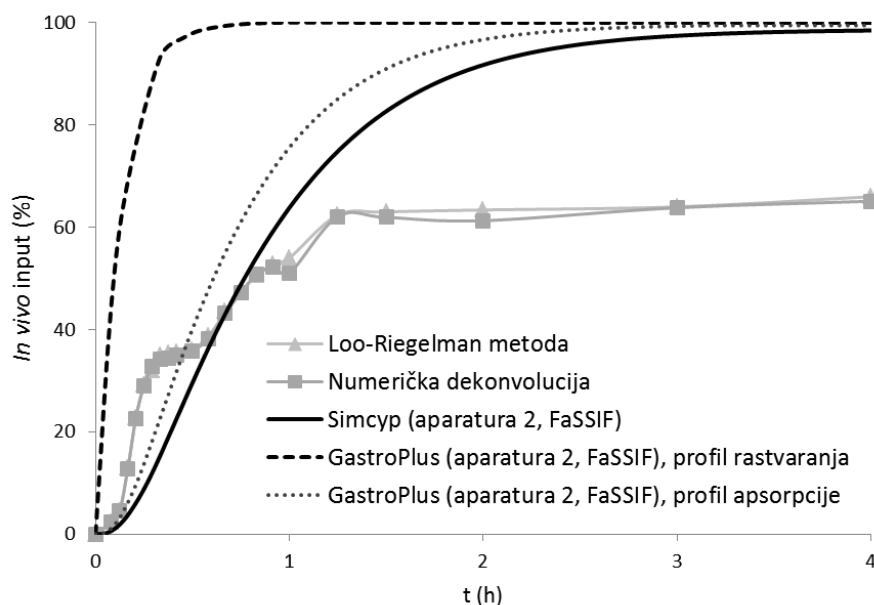
Simulirani profili apsorpcije acetilsalicilne kiseline iz tableta dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u prikazani su na slici 29. Predviđeni obim apsorpcije acetilsalicilne kiseline od 100% koji se beleži na osnovu profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom i medijumuma FaSSIF, FeSSIF i njihovim „praznim“ puferima i FP pH 5,8, u saglasnosti je sa literaturnim podacima o potpunoj apsorpciji acetilsalicilne kiseline iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Hutt i sar, 1986; Needs i Brooks, 1985).



Slika 29. Simulirani profili apsorpcije acetilsalicilne kiseline iz tableta dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u GastroPlus™-u

Uporedni prikaz *in vivo* input profila dobijenih konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom korišćenjem Simcyp® i GastroPlus™ programskih paketa za tablete sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline prikazani su na slici 30. Poređenjem profila apsorpcije koji su dobijeni GI simulacijom u Simcyp®-u i GastroPlus™-u može se uočiti da Simcyp® predviđa nešto sporiju apsorpciju leka u poređenju sa GastroPlus™, ali je u oba slučaja predviđen isti obim apsorpcije od 100%. Poređenjem profila rastvaranja dobijenih konvencionalnom farmakokinetičkom analizom sa profilima dobijenim gastrointestinalnom simulacijom u GastroPlus™-u mogu se uočiti značajne razlike u predviđenoj brzini i obimu rastvaranja. Naime, profili dobijeni konvencionalnom farmakokinetičkom analizom prikazuju nepotpuno rastvaranje acetilsalicilne kiseline gde je postignut plato od 65%, dok je gastrointestinalnom simulacijom predviđeno brzo i potpuno rastvaranje acetilsalicilne kiseline.

Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost mehanističkog sagledavanja procesa rastvaranja i apsorpcije korišćenjem gastrointestinalne simulacije gde se svaki od procesa može odvojeno pratiti, dok je kod konvencionalne farmakokinetičke analize nemoguće izdvojiti rastvaranje i apsorpciju od ostalih faktora koji utiču na biološku raspoloživost (npr. presistemički metabolizam). Na slici 30 su radi preglednosti prikazani samo *input* profili dobijeni na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FaSSIF-a.



Slika 30. *In vivo* input profili acetilsalicilne kiseline dobijeni različitim metodama dekonvolucije

## 4.2.6 *In vitro-in vivo* korelacija

### Dekonvolucioni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati različitim metodama analizirani su u odnosu na *in vitro* rezultate brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta dobijene pod različitim eksperimentalnim uslovima.

Tabela 19. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline, kao i odgovarajući faktori skaliranja vremenske ose

<i>In vitro</i> profil		$\tau_a$ (h)	$\beta$	TS			
Uređaj	Medijum/ protok			Loo-Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2 (50 o/min)	bFaSSGF	0,28	1,13	1,9	1,9	3,4	2,8
	FaSSGF	0,32	1,24	1,7	1,7	3,0	2,4
	bFaSSIF	0,12	1,14	4,5	4,5	7,9	6,5
	FaSSIF	0,13	1,07	4,2	4,2	7,3	6,0
	bFeSSIF	0,33	0,93	1,6	1,6	2,9	2,4
	FeSSIF	0,33	0,89	1,6	1,6	2,9	2,4
	bFeSSIF/0,5 % HPMC	0,26	1,49	2,1	2,1	3,7	3,0
	FP pH 5,8	0,12	0,83	4,5	4,5	7,9	6,5
Aparatura 4	4 ml/min	0,73	1,88	0,7	0,7	1,3	1,1
	8 ml/min	0,76	1,91	0,7	0,7	1,3	1,0

S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale, TS. Hipotetički input profili dobijeni korišćenjem različitih dekonvolucionih metoda, kao i eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja fitovani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Faktori skaliranja vremenske ose izračunati su kao odnos  $\tau_{d\text{vivo}}$  i  $\tau_{d\text{vitro}}$  (tabela 19). Može se uočiti da se vrednosti faktora skaliranja vremenske ose značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene dekonvolucione metode, kao i *in vitro* profila brzine rastvaranja i kreću se u opsegu 0,7 do 7,9.

Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom za tablete sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline nakon korekcije vremenske ose odgovarajućim faktorom skaliranja prikazani su u tabeli 20. Najbolja korelacija, odnosno vrednosti nagiba regresione prave približno broju jedan, kao i visoka vrednost koeficijenta korelacije dobijena je kada su *in vitro* profili brzine rastvaranja dobijeni u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FaSSIF medijuma odnosno njegovog „praznog“ pufera poređeni sa *in vivo* profilima dobijenim gastrointestinalnom simulacijom korišćenjem Simcyp® i GastroPlus™ programskih paketa. Visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisan vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0,95, dobijen je u svim ispitivanim slučajevima kada su korišćeni *in vitro* profili brzine rastvaranja kod kojih je >65% lekovite supstance rastvoreno nakon 30 min. Dobijeni rezultati potvrđuju da se razvijeni *in silico* modeli mogu uspešno koristiti za identifikaciju *in vivo* input profila acetilsalicilne kiseline kao alternativa konvencionalnoj farmakokinetičkoj analizi, što predstavlja osnov za razvoj bioprediktivnih metoda za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline, kao i postavljanje klinički relevantnih specifikacija.

Tabela 20. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro input/ in vivo input</i>		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uredaj	Medijum/protok					
Aparatura 2	bFaSSGF	a	1,434	1,430	1,672	1,583
		r	0,970	0,972	0,972	0,962
	FaSSGF	a	1,281	1,278	1,953	1,808
		r	0,934	0,935	0,960	0,923
	bFaSSIF	a	0,658	0,650	1,087	1,075
		r	0,983	0,984	0,993	0,997
	FaSSIF	a	0,672	0,666	1,012	1,023
		r	0,985	0,986	0,993	0,996
	bFeSSIF	a	0,717	0,702	1,201	0,915
		r	0,973	0,973	0,967	0,813
	FeSSIF	a	0,717	0,701	1,198	0,920
		r	0,973	0,973	0,953	0,815
	bFeSSIF/0,5% HPMC	a	1,998	1,985	1,148	1,047
		r	0,917	0,919	0,917	0,893
FP 5,8	a	0,703	0,696	1,096	1,098	
	r	0,983	0,985	0,991	0,991	
Aparatura 4	4 ml/min	a	0,533	0,521	0,721	0,823
		r	0,956	0,958	0,919	0,925
	8 ml/min	a	0,502	0,498	0,742	0,837
		r	0,942	0,943	0,872	0,935

a – nagib regresione prave; r – koeficijent korelacije

## Konvolucioni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije, profili koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi predviđeni primenom GI simulacije u Simcyp® i GastroPlus™ programskim paketima analizirani su u odnosu na srednji farmakokinetički profil uočen u *in vivo* u studiji Voelker i Hammer (2012) za tablete sa trenutnim oslobađanjem.

Statistički parametri linearne regresione analize prikazani su u tabeli 21. Prikazani rezultati dobijeni konvolucionom metodom u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim dekonvolucionim pristupom. Naime, statistički parametri dobijeni konvolucionim pristupom potvrđuju uspostavljanje IVIVK nivoa A ukoliko je kao ulazni profil za gastrointestinalnu simulaciju korišćen profil koji pokazuje više od 65% rastvorenog leka nakon 30 min.

Tabela 21. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za tablete sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline primenom gastrointestinalne simulacije (konvolucioni pristup)

Uređaj	<i>In vitro</i> profil Medijum/protok	Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
		a	r	a	r
Aparatura 2	bFaSSGF	1,922	0,742	2,427	0,897
	FaSSGF	1,878	0,748	2,398	0,901
	bFaSSIF	0,944	0,966	0,965	0,988
	FaSSIF	0,951	0,970	0,968	0,991
	bFeSSIF	0,915	0,952	1,005	0,988
	FeSSIF	0,924	0,963	1,008	0,989
	bFeSSIF/0,5% HPMC	2,784	0,914	3,164	0,934
	FP pH 5,8	0,935	0,962	0,945	0,971
Aparatura 4	4 ml/min	2,224	0,816	2,002	0,893
	8 ml/min	1,945	0,843	1,845	0,901

a – nagib regresione prave; r – koeficijent korelacije

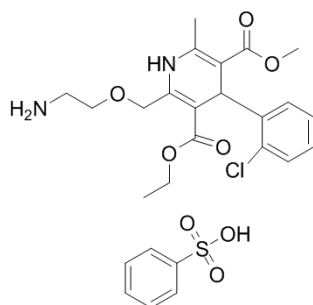
Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom u saglasnosti su sa pH-zavisnom rastvorljivošću acetilsalicilne kiseline ukazujući da pH vrednost medijuma, a ne prisustvo fizioloških surfaktanata dominantno utiču na brzinu rastvaranja acetilsalicilne kiseline. U aparaturi sa protočnom ćelijom zabeleženo je značajno sporije rastvaranje acetilsalicilne kiseline. Ovakvi rezultati su pre svega posledica činjenice da se pH vrednost pri izmeni medijuma u protočnoj ćeliji postepeno povećava i prelazi pKa vrednost (kada se povećava rastvorljivost acetilsalicilne kiseline) tek nakon izvesnog vremena, kao i da je lek u toku prvog sata ispitivanja izložen manjoj zapremini medijuma u poređenju sa aparaturom sa lopaticom.

Na osnovu odabranog seta ulaznih podataka, primenom oba programska paketa, uspešno je simuliran profil koncentracije acetilsalicilne kiseline u plazmi koji prati oralnu primenu tableta sa trenutnim oslobađanjem. Predviđeni obim apsorpcije leka od 100% je u skladu sa literaturnim podacima koji navode da se acetilsalicilna kiselina u potpunosti apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta. Simulacijama je pokazano da *in vitro* profil brzine rastvaranja acetilsalicilne kiseline iz tableta sa trenutnim oslobađanjem nema značajnog uticaja na profil koncentracije leka u plazmi ukoliko je 65% acetilsalicilne kiseline rastvoreno nakon 30 min ispitivanja. Oba programska paketa dala su vrlo slična predviđanja obima i brzine apsorpcije s tim što je nešto sporija apsorpcija zabeležena u Simcyp® programskom paketu, što bi se moglo pripisati razlikama koje postoje u osnovnim podešavanjima ACAT i ADAM modela apsorpcije.

U postupku uspostavljanja IVIVK oba pristupa su pokazala da je najveći stepen korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka postignut u slučajevima primene aparature sa lopaticom i FaSSIF medijuma odnosno njegovog praznog pufera i fosfatnog pufera pH vrednosti 5,8, te bi se navedeni eksperimentalni uslovi mogli predložiti kao klinički relevantni. Visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisan vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0,95

dobijen je u svim ispitivanim slučajevima kada su korišćeni *in vitro* profili brzine rastvaranja kod kojih je >65% lekovite supstance rastvoreno nakon 30 min, što bi se moglo predložiti kao klinički relevantna specifikacija za tablete sa trenutnim oslobađanjem acetilsalicilne kiseline.

### 4.3 MODEL SUPSTANCA: AMLODIPIN-BESILAT



3-etil-5-metil ( $\pm$ )-2-[(2-aminoetoksi) metil]-4-(2-hlorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridindikarboksilat, monobenzensulfonat

Slika 31. Strukturna formula i hemijski naziv amlodipin-besilata

Amlodipin je blokator kalcijumovih kanala iz grupe dihidropiridina (antagonist kalcijumovih jona ili blokator sporih kalcijumovih kanala) koji inhibira transmembranski influks kalcijumovih jona u glatke mišiće krvnih sudova i srčani mišić. Kao i drugi blokatori kalcijumovih kanala, amlodipin relaksira glatku muskulaturu arterijskog zida (vazodilatacija), smanjujući ukupni periferni otpor, a time i krvni pritisak. Kod pacijenata sa stabilnom anginom pectoris smanjenje perifernog otpora (*afterload*) dovodi i do smanjenja potrebe miokarda za kiseonikom i ublažavanja simptoma bolesti. U eksperimentima *in vitro* na životinjskim modelima i ljudskim koronarnim arterijama dokazano je da amlodipin blokira konstrikciju i obnavlja protok krvi kroz koronarne arterije i arteriole. Inhibicija koronarnog spazma je objašnjenje efektivnosti amlodipina u terapiji vazospastične (Prinzmetalove, promenljive) angine (Clavijo, 1994). Uobičajna početna doza kod odraslih je 5 mg jednom dnevno, što se može povećati do maksimalne doze od 10 mg u zavisnosti od individualnog odgovora pacijenata (Farmakoterapijski vodič, 2022).

#### 4.3.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva amlodipina

Amlodipin-besilat je beo kristalan prašak, molekulske mase 567,05 g/mol. Teško je rastvorljiv u vodi, lako rastvorljiv u metanolu, dosta teško rastvorljiv u etanolu i teško rastvorljiv u 2-propanolu (European Pharmacopoeia, 2019). Eksperimentalno dobijena vrednost za rastvorljivost amlodipina u vodi je 75,3 mg/L (Law i sar, 2014). Najniža rastvorljivost u pH opsegu od 1 do 6,8 na 37 °C je 1 mg/ml (Shohin i sar, 2010). U fiziološkom opsegu pH vrednosti u gastrointestinalnom traktu, amlodipin je prisutan u jonizovanom obliku (slaba baza, pKa 8,6) (Law i sar, 2014; Shohin i sar, 2010). U našoj zemlji registrovani su preparati sa dozom od 5 i 10 mg amlodipina u obliku amlodipin-besilata. Dozni broj za amlodipin dobija se na osnovu maksimalne pojedinačne terapijske doze i minimalne vrednosti za rastvorljivost u pH opsegu od 1-6,8 i iznosi 0,04 ( $D_0 = M_0/V_0C_s$ ), dakle manji je od 1, pa se, stoga, amlodipin smatra visoko rastvorljivom supstancom prema BCS klasifikaciji. Do istog zaključka se dolazi i ukoliko se za rastvorljivost amlodipina uzme podatak o njegovoj rastvorljivosti u vodi (75,3 mg/L, odnosno 0,075 mg/ml), s obzirom da je ta vrednost manja od najniže vrednosti za rastvorljivost u pH opsegu od 1-6,8, dobija se da je dozni broj amlodipina 0,53.

Što se tiče permeabilnosti, prema ICH M9 smernici, supstanca se smatra visoko permeabilnom kada se apsorbuje u obimu  $\geq 85\%$  (EMA, 2020). Iako su *in vivo* studije pokazale da je apsolutna bioraspoloživost amlodipina je oko 64%, on se ipak klasifikuje kao “visoko permeabilna“ lekovita supstanca s obzirom na izražen presistemskei metabolizam i visok udeo

metabolita u urinu (oko 90%) (Beresford i sar, 1988). Prethodno navedeni podaci o rastvorljivosti i permeabilnosti amlodipina svrstavaju ga u klasu 1 BCS.

Maksimalne koncentracije amlodipina u plazmi postižu se 6-12 h nakon oralne primene preparata. Apsolutna bioraspoloživost amlodipina se kreće u rasponu od 64-90%. Oko 93% amlodipina u krvi vezuje se za proteine plazme. Glavni put eliminacije je metabolizam u jetri (oko 90%), preko CYP 3A4 izoenzima (vrlo malo CYP 3A5). Urinom se eliminiše oko 6% nepromenjene supstance a ostatak u vidu neaktivnih metabolita (Beresford i sar, 1988). Poluvreme eliminacije amlodipina je 35-50 h (Law i sar, 2014; Farmakoterapijski vodič, 2022). Ravnotežna koncentracija amlodipina u krvi postiže se nakon 7-8 dana svakodnevnog doziranja. Oslabljena funkcija bubrega nema značajan uticaj na farmakokinetiku amlodipina, te stoga pacijenti sa bubrežnom insuficijencijom mogu dobijati uobičajene inicijalne doze leka. Stariji pacijenti i pacijenti sa oslabljenom funkcijom jetre imaju smanjen klirens amlodipina, usled čega je za 40-60 % povećana PIK, pa je potrebno smanjiti inicijalnu dozu amlodipina. Nije zabeležen uticaj hrane na bioraspoloživost amlodipina (Farmakoterapijski vodič, 2022).

### 4.3.2 *In vivo* podaci

Detaljnim pregledom *in vivo* studija dostupnih u literaturi za različite farmaceutske oblike amlodipina, u cilju biofarmaceutske karakterizacije izabrani su literaturni profili koncentracija amlodipina u plazmi dobijeni nakon intravenske primene bolus injekcije i oralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem (Faulkner i sar, 1986).

Faulkner i sar. (1986) poredili su farmakokinetiku amlodipina nakon intravenske primene 10 mg leka na gladno, kao i nakon 14 dana ponovljene oralne primene 10 mg amlodipina. Došli su do zaključka da je apsorpcija amlodipina potpuna, a da je eliminacija spora i odvija se metabolizmom u jetri, kao i da je apsolutna biološka raspoloživost oko 64% i da ne postoje velike interindividualne razlike. Zabeležena je velika vrednost volumena distribucije (21,41 L/kg) ukazujući da se lekovita supstanca intenzivno distribuira u tkiva. Nakon intravenske primene pad koncentracije lekovite supstance u plazmi dešava se relativno brzo, takođe govoreći u prilog prelaska amlodipina iz plazme u periferna tkiva. Nakon oralne primene lek se pojavljuje u plazmi nakon 0,5-1 h, ali je apsorpcija spora te se maksimum koncentracije leka u plazmi postiže nakon 8 h. Dugo poluvreme eliminacije ima pozitivan uticaj na ravnotežnu koncentraciju lekovite supstance u plazmi i omogućava njeno održavanje upotrebom jednom dnevno. Osnovni farmakokinetički parametri uočeni nakon primene izabranih farmaceutskih oblika amlodipina prikazani su u tabeli 22.

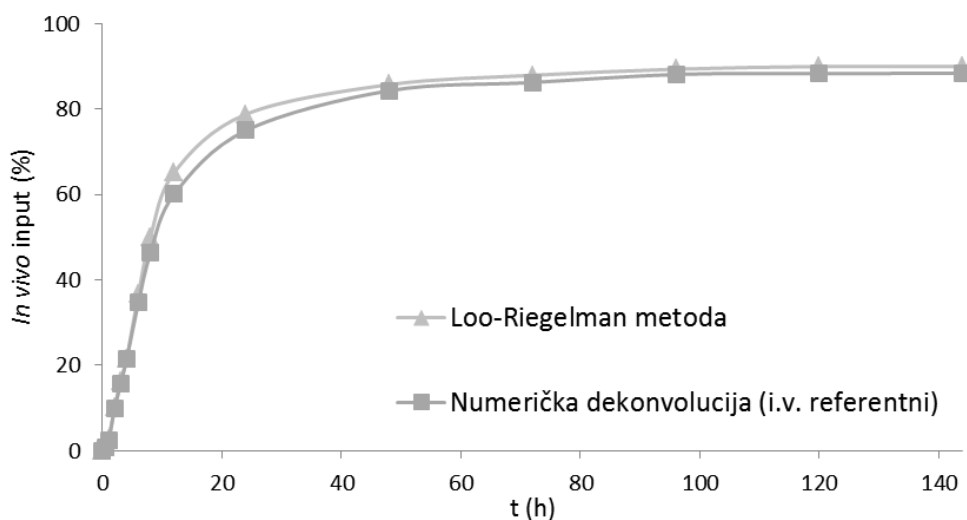
Tabela 22. Farmakokinetički parametri različitih farmaceutskih oblika amlodipina

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-∞</sub> (ngh/ml)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	Referenca
i.v. bolus injekcija (10 mg)	371±69	/	33,8±5,3	/	Faulkner i sar, 1986
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (10 mg)	238±53	5,9±1,2	35,7±6,1	7,6±1,8	Faulkner i sar, 1986

### 4.3.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila amlodipina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

U cilju dobijanja profila apsorpcije amlodipina *in vivo* primenjene su Loo-Riegelman metoda i numerička dekonvolucija u odnosu na profil dobijen nakon intravenske primene upotrebom softverskog paketa Kinetica 5.0 i literaturnih profila koncentracija amlodipina u plazmi nakon primene analiziranih preparata. *In vivo* input profili dobijeni Loo-Riegelman

metodom i numeričkom dekonvolucijom na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene kao težinske funkcije prikazani su na slici 32.



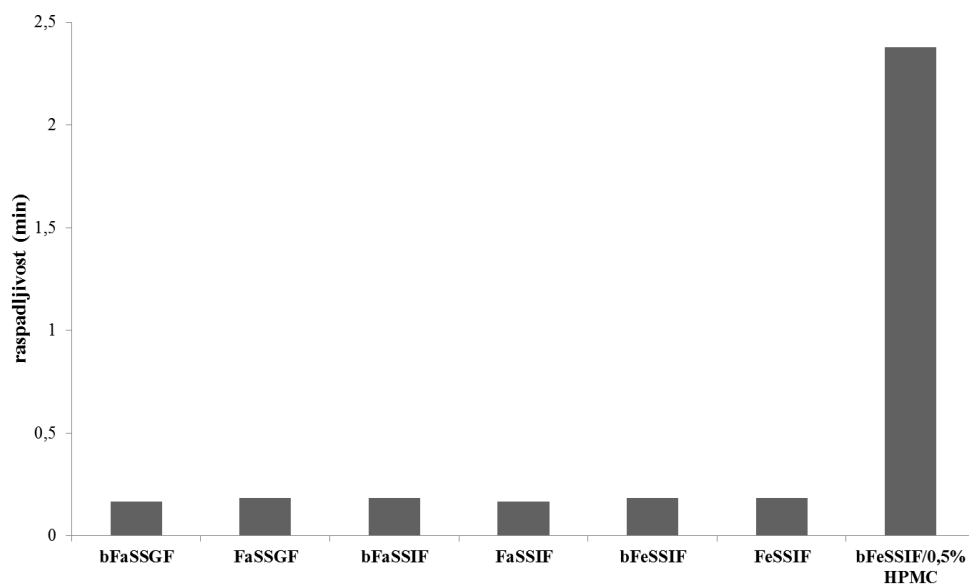
Slika 32. *In vivo* input profili amlodipina za tablete sa trenutnim oslobađanjem (Faulkner i sar, 1986) dobijeni primenom konvencionalne farmakokinetičke analize

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 32 može se uočiti da ne postoje značajne razlike između input profila dobijenih primenom Loo-Riegelman metode i numeričke dekonvolucije. Oba profila ukazuju na obim apsorpcije od oko 89% što odgovara literaturnim podacima (Beresford i sar, 1988; Faulkner i sar, 1986).

#### 4.3.4 *In vitro* ispitivanja

##### Raspadljivost tableta

Na slici 33 prikazani su rezultati ispitivanja raspadljivosti tableta sa trenutnim oslobađanjem amlodipin-besilata. Tablete se u neviskoznim medijumima raspadaju veoma brzo, prosečno za oko 11 s, dok dodatak HPMC-a u medijum produžava vreme raspadanja tableta amlodipin-besilata (raspadljivost je 2,38 min).

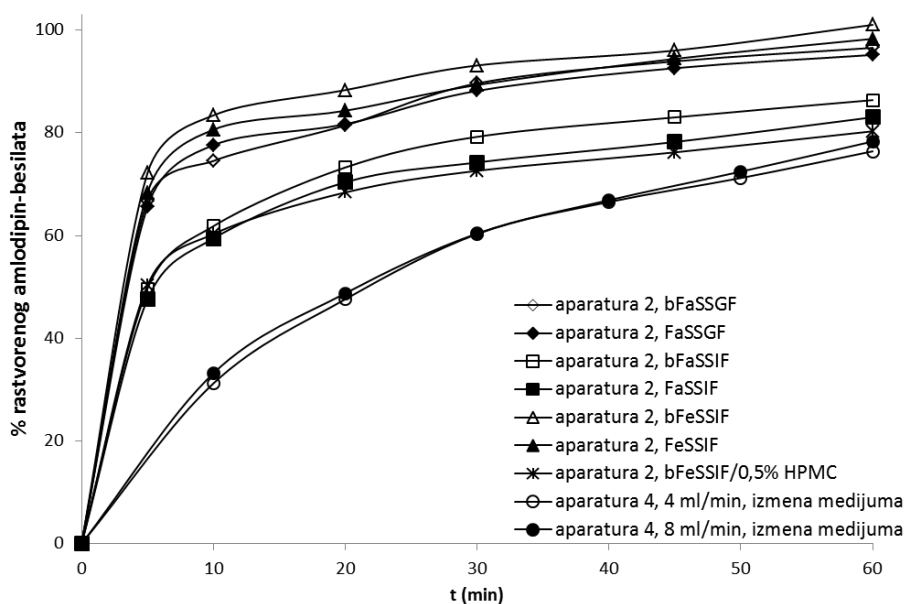


Slika 33. Raspadljivost tableta amlodipin-besilata u različitim medijumima



## Brzina rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta

Ekperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta u aparaturi sa lopaticom u razliĉitim medijumima i aparaturi sa protoĉnom ćelijom uz korišćenje izmene medijuma (15 min bFaSSGF / 45 min bFaSSIF) prikazani su na slici 34.



Slika 34. Profili brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćenjem razliĉitih aparatura i medijumima

Prikazani rezultati ukazuju da eksperimentalni uslovi znaĉajno utiĉu na brzinu rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta. U aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FaSSGF i FeSSIF, odnosno njihovih „praznih“ pufera dobijeni su profili koji odgovaraju brzom rastvaranju (više od 85% za 30 min) uz neznatni uticaj dodatka surfaktanata na brzinu rastvaranja. U medijumima pH 6,5 (FaSSIF i bFaSSIF) amlodipin-besilat se rastvara nešto sporije (75% nakon 30 min). Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa baznim karakteristikama amlodipin-besilata gde se oĉekuje bolja rastvorljivost lekovite supstance u medijumima niĉih vrednosti pH. Sliĉan profil rastvaranja lekovite supstance zabeleĉen je i u viskoznom medijumu (oko 75% lekovite supstance rastvoreno nakon 30 min).

U aparaturi sa protoĉnom ćelijom zabeleĉeno je znaĉajno sporije i nepotpuno rastvaranje amlodipin-besilata (za 30 min rastvoreno je oko 60% lekovite supstance), reflektujuĉi time znaĉajno blaĉu hidrodinamiku aparature sa protoĉnom ćelijom u poreĉenju sa aparaturom sa lopaticom (D'Arcy, 2007; D'Arcy i sar, 2011). Nije zabeleĉen uticaj brzine protoka medijuma na brzinu rastvaranja amlodipin-besilata.

### 4.3.5 *In silico* ispitivanja

U okviru ovog poglavlja biće opisana GI simulacija apsorpcije amlodipina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćenjem programskih paketa Simcyp<sup>®</sup> i GastroPlus<sup>™</sup> u cilju mehanistiĉke interpretacije apsorpcije amlodipina, identifikacije bioprediktivne metode i postavljanja kliniĉki relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja.

### 4.3.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa

#### Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije amlodipina iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa *Simcyp® Population - Based Simulator* (verzija 13.2, Certara™, SAD). Simulacija apsorpcije sprovedena je korišćenjem fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 23, čije su vrednosti preuzete iz literature ili su *in silico* predviđene. S obzirom da su koncentracije amlodipina u biološkim tečnostima izražene za amlodipin, doza amlodipina korišćena za simulacije je takođe izražena kao slobodna baza. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. Validacija modela sprovedena je na osnovu srednjeg profila koncentracije amlodipina u plazmi iz studije Faulkner i sar. (1986).

Tabela 23. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije amlodipina

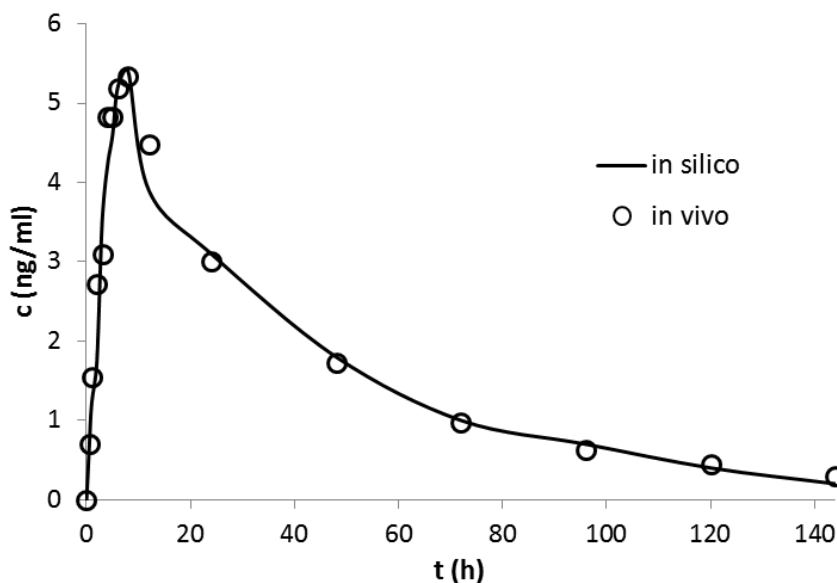
Parametar (jedinica mere)	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	567,051
logP <sub>o:w</sub>	2,96 <sup>a</sup>
Monoprotonska baza	
pKa	9,1 <sup>a</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>b</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub>	0,02 <sup>c</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, P <sub>eff</sub> (cm/s)	0,0743·10 <sup>-4</sup> <sup>d</sup>
Rastvorljivost (mg/ml)	0,0774 na pH 7,4 <sup>e</sup>
Konstanta precipitacije (h <sup>-1</sup> )	4 <sup>b</sup>
Radijus čestica lekovite supstance (μm)	10 <sup>b</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>b</sup>
Distribucija	
Potpuni PBPK model, metoda 1	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, V <sub>ss</sub> (L/kg)	20,54 <sup>f</sup>
Eliminacija	
CL <sub>iv</sub> (L/h)	33,9 <sup>g</sup>
CL <sub>r</sub> (L/h)	1,8 <sup>h</sup>
Metabolizam	CYP 3A4 <sup>h</sup>
CL <sub>int</sub> (L/h)	182 <sup>i</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	10
Vreme simulacije (h)	144
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250

<sup>a</sup>Podatak iz literature (Caron i sar, 2004); <sup>b</sup> Simcyp® vrednost; <sup>c</sup> Podatak iz literature (Meredith i Elliott, 1992); <sup>d</sup> Podatak iz literature (Patel i sar, 2010); <sup>e</sup>Podatak iz literature (Mc Daid i Deasy, 1996); <sup>f</sup> Vrednost izračunata u Simcyp®-u korišćenjem Potpuni PBPK modela distribucije; <sup>g</sup> Podatak iz literature (Faulkner i sar, 1986) <sup>h</sup> Podatak iz literature (Beresford i sar, 1988); <sup>i</sup> Predviđena vrednost korišćenjem Simcyp® Parameter Estimation opcije

Apsorpcija amlodipina iz GI trakta simulirana je korišćenjem ADAM modela. U simulacijama je korišćen podatak o permeabilnosti amlodipina 0,0743·10<sup>-4</sup> cm/s iz studije Patel i sar. (2010), dok je podatak o rastvorljivosti na pH 7,4 prezet iz ispitivanja Mc Daid i Deasy (1996). Volumen distribucije predviđen je u Simcyp®-u na osnovu potpunog PBPK modela distribucije i metode Poulin i Theil (metoda 1) i iznosi 20,54 L/kg što je u saglasnosti sa

literaturnim podacima (Faulkner i sar, 1986). Vrednost slobodne frakcije leka u plazmi preuzeta je iz studije Meredith i Elliott (1992). Kao glavni put eliminacije amlodipina naveden je metabolizam u jetri preko CYP3A4 izoenzima (Beresford i sar, 1988) gde je vrednost  $CL_{int}$  optimizovana korišćenjem *Simcyp*<sup>®</sup> *Parameter Estimation* opcije i iznosi 182 L/h, dok je kao podatak o regionalnoj zastupljenosti CYP3A4 izoenzima u GIT-u i jetri korišćena *Simcyp*<sup>®</sup> osnovna vrednost. Renalni klirens  $CL_R$  izračunat je na osnovu navoda da predstavlja 6% ukupnog klirensa (Beresford i sar, 1988). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

Simulirani profil koncentracije amlodipina u plazmi na osnovu ulaznih parametara prikazanih u tabeli 23 u saglasnosti je sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Faulkner i sar, 1986) što je prikazano na slici 35, a potvrđeno izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), prikazanih u tabeli 24.



Slika 35. Simulirani profil koncentracije amlodipina u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na *in vivo* profil

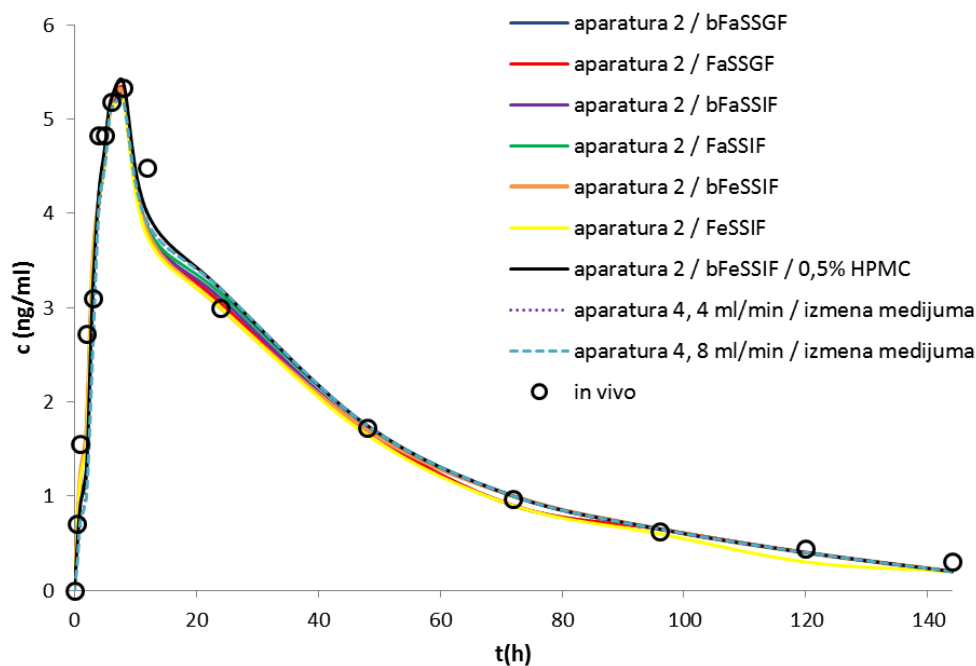
S obzirom da greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ) ne prelaze 10%, model se smatra validiranim i kao takav korišćen je za dalja *in silico* ispitivanja.

Tabela 24. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara amlodipina i odgovarajućih greški predviđanja

Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{max}$ (ng/ml)	5,29	5,34	0,94
$t_{max}$ (h)	8,00	8,10	1,25
$PIK_{0-t}$ (ngh/ml)	231,20	225,60	2,42

### Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Da bi se ispitaio uticaj brzine rastvaranja na profil koncentracije amlodipina u plazmi u funkciji vremena, eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije. Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 36, a izabrani farmakokinetički parametri ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 25.



Slika 36. *In vivo* uočen i simulirani profili koncentracije amlodipina u plazmi

Rezultati simulacija ukazuju da ispitivani profili brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta nemaju značajnog uticaja na rezultate GI simulacije ukoliko je minimum 60% lekovite supstance rastvoreno u toku 30 min, čak i u slučaju značajno sporijeg rastvaranja koje je zabeleženo u aparaturi sa protočnom ćelijom. Simulirani profil koncentracije amlodipina u plazmi kada je kao ulazni parametar korišćen *in vitro* profil brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje viskoznog medijuma ukazuje da nema promene u brzini i obimu apsorpcije amlodipina prilikom uzimanja leka sa hranom. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa *in vivo* ispitivanjima uticaja hrane na farmakokinetiku amlodipina koji su pokazali da ne postoji značajan uticaj hrane na biološku raspoloživost amlodipina (Farmakoterapijski vodič, 2022).

Tabela 25. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta i odgovarajuće greške predviđanja

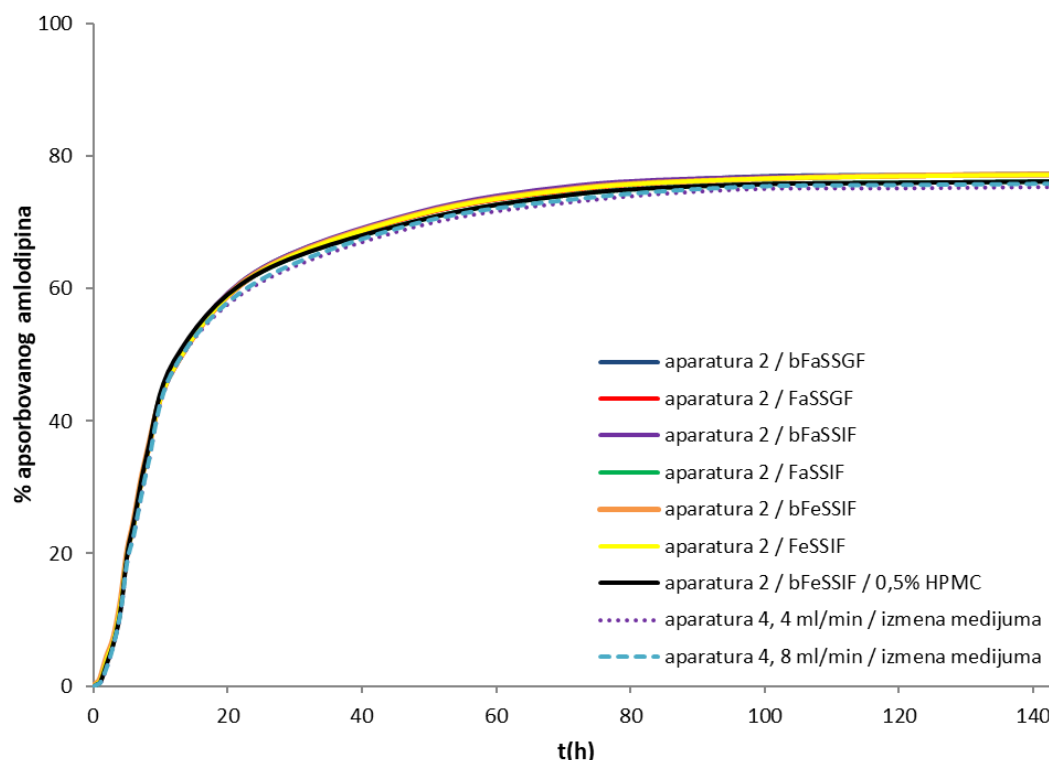
<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	(ng/ml)		(h)		(ngh/ml)	
Aparatura 2	bFaSSGF	5,35	1,13	8,2	2,50	222,30	3,84
	FaSSGF	5,30	0,19	8,2	2,50	218,30	5,57
	bFaSSIF	5,20	1,70	8,4	5,00	210,40	8,99
	FaSSIF	5,10	3,59	8,4	5,00	206,20	10,81
	bFeSSIF	5,40	2,08	8,2	2,50	225,50	2,46
	FeSSIF	5,35	1,13	8,2	2,50	224,50	2,89
	bFeSSIF/0,5% HPMC	5,10	3,59	8,4	5,00	212,40	8,13
Aparatura 4	4 ml/min	4,95	6,43	8,5	6,25	198,30	14,23
	8 ml/min	5,01	5,29	8,5	6,25	199,20	13,84
<i>In vivo</i>		<b>5,29</b>	/	<b>8,00</b>	/	<b>231,2</b>	/

### Identifikacija profila apsorpcije amlodipina primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija procesa apsorpcije amlodipina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem sprovedena je korišćenjem prethodno razvijenog i validiranog modela gastrointestinalne simulacije. Cilj ovih

simulacija je procena mogućnosti primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila, kao i uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa.

*In silico* profili apsorpcije amlodipina dobijeni gastrointestinalnom simulacijom na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 37. Može se uočiti da u slučaju kada je više od 60% leka rastvoreno nakon 30 min, nema značajnog uticaja brzine rastvaranja na apsorpciju amlodipina. U svim simulacijama zabeležena je postupna apsorpcija amlodipina, a predviđeni obim apsorpcije iznosi oko 78%. Ovakvi rezultati u saglasnosti su literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti amlodipina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem i ukazuju da model odlično simulira apsorpciju amlodipina iz gastrointestinalnog trakta (Beresford i sar, 1988).

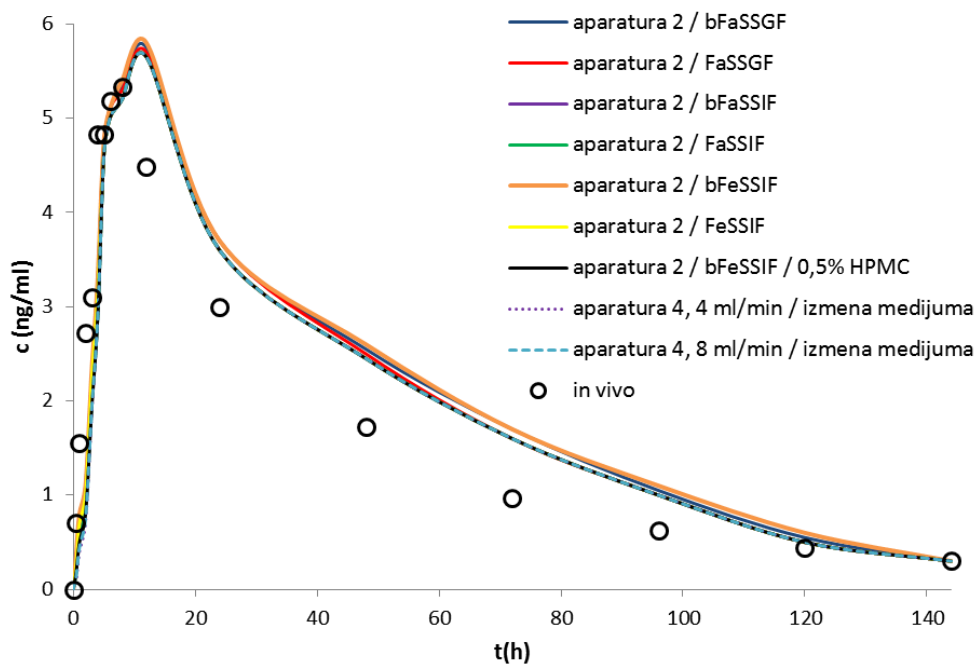


Slika 37. Simulirani *in vivo* profili apsorpcije amlodipina na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja

#### 4.3.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja vrednosti ulaznih parametara prikazane u tabeli 23 primenjene su u okviru komercijalno dostupnog GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) programskog paketa. Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija. Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode Poulin i Theil i dobijena je vrednost od 18,4 L/kg. Eliminacija leka iz centralnog prostora iskazana je kroz ukupni klirens, sa vrednošću 0,42 L/hkg koja je preuzeta iz studije Faulkner i sar. (1986).

Simulirani profili koncentracije amlodipina u plazmi dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta sa trenutnim oslobađanjem pod različitim eksperimentalnim uslovima prikazani su na slici 38.



Slika 38. Simulirani profili koncentracije amlodipina u plazmi na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja zajedno sa *in vivo* uočenim profilom

Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ) dobijene GastroPlus™ simulacijom na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 26. Može se uočiti da su GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa dobijene nešto više vrednosti  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ , kao i više vrednosti za odgovarajuće greške predviđanja. Zabeležena odstupanja posmatranih farmakokinetičkih parametara ulaze u opseg standardne devijacije iz *in vivo* ispitivanja. Gastrointestinalna simulacija u GastroPlus™ programskom paketu takođe je potvrdila neznan uticaj *in vitro* profila brzine rastvaranja na simulirani profil koncentracije amlodipina u plazmi ukoliko je više od 60% leka rastvoreno u toku 30 min.

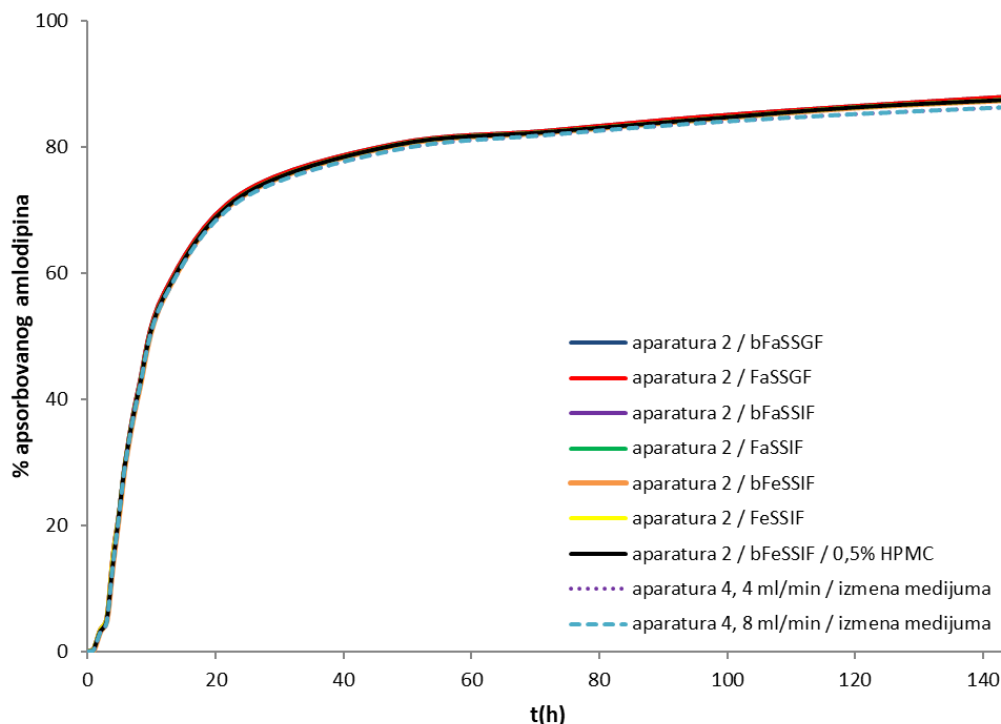
Tabela 26. Farmakokinetički parametri amlodipina predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa kao i odgovarajuće greške predviđanja

<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	(ng/ml)		(h)		(ngh/ml)	
Aparatura 2	bFaSSGF	5,91	11,72	10,20	27,50	295,50	27,81
	FaSSGF	5,80	9,64	10,20	27,50	293,20	26,81
	bFaSSIF	5,75	8,69	10,30	28,75	288,70	24,87
	FaSSIF	5,70	7,75	10,30	28,75	286,30	23,83
	bFeSSIF	5,83	10,21	10,20	27,50	296,30	28,15
	FeSSIF	5,80	9,64	10,20	27,50	297,30	28,58
	bFeSSIF/0,5% HPMC	5,81	9,83	10,30	28,75	287,50	24,35
Aparatura 4	4 ml/min	5,75	8,69	10,30	28,75	275,30	19,07
	8 ml/min	5,82	10,02	10,30	28,75	279,20	20,76
<i>In vivo</i> profil		<b>5,29</b>	/	<b>8,00</b>	/	<b>231,20</b>	/

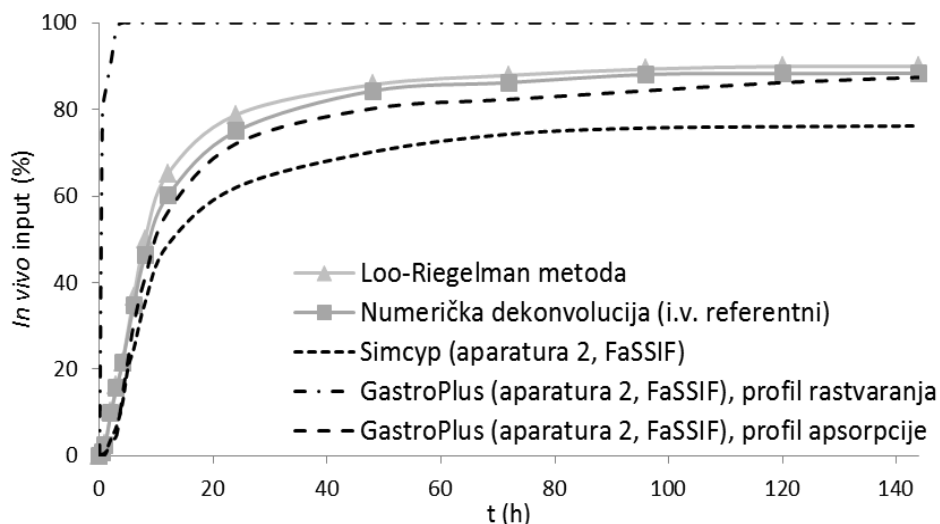
### Identifikacija profila apsorpcije amlodipina primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

U ovoj fazi ispitana je mogućnost primene GI simulacije u GastroPlus™-u za identifikaciju *in vivo* inputa, koji će se potom koristiti za uporednu analizu sa rezultatima dobijenim

konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i gastrointestinalnom simulacijom u Simcyp®-u, kao i za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije. Simulirani profili apsorpcije amlodipina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem prikazani su na slici 39. Predviđeni obim apsorpcije amlodipina od oko 88% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o obimu apsorpcije amlodipina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Beresford i sar, 1988).



Slika 39. Simulirani profili apsorpcije amlodipina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni GastroPlus™ gastrointestinalnom simulacijom



Slika 40. *In vivo* input profili amlodipina dobijeni primenom različitih metoda dekonvolucije

Uporedni pregled *in vivo* input profila dobijenih konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i gastrointestinalnom simulacijom korišćenjem Simcyp® i GastroPlus™ programskih paketa za tablete sa trenutnim oslobađanjem amlodipin-besilata prikazani su na slici 40. Profili apsorpcije amlodipina dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u na osnovu eksperimentalnih *in*

*in vitro* profila, pokazuju istu kinetiku apsorpcije kao i profili apsorpcije izračunati Loo-Riegelman metodom i numeričkom dekonvolucijom u odnosu na *i.v.* profil kao referentni, dok je korišćenjem istih *in vitro* profila u Simcyp®-u predviđena nešto sporija apsorpcija kao i niži obim apsorpcije amlodipina. Rezultati dobijeni gastrointestinalnom simulacijom ukazuju da rastvaranje amlodipin-besilata ne predstavlja ograničavajući faktor za apsorpciju lekovite supstance *in vivo* ukoliko je više od 60% lekovite supstance rastvoreno nakon 30 min. Na slici 40 su radi preglednosti prikazani samo profili dobijeni na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FaSSIF-a kao medijuma.

### 4.3.6 *In vitro-in vivo* korelacija

#### Dekonvolucionni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati različitim metodama konvencionalne farmakokinetičke analize i profili predviđeni GI simulacijom analizirani su u odnosu na *in vitro* rezultate brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijene pod različitim eksperimentalnim uslovima.

Tabela 27. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem amlodipin-besilata kao i odgovarajući faktori skaliranja vremenske ose

<i>In vitro</i> profil		TS					
Uređaj	Medijum/protok	$\tau_a$ (h)	$\beta$	Loo-Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2	bFaSSGF	0,080	0,39	135,8	121,5	158,0	140,4
	FaSSGF	0,077	0,35	141,2	126,2	164,1	145,8
	bFaSSIF	0,130	0,52	83,6	74,8	97,2	86,4
	FaSSIF	0,135	0,49	80,5	72,0	93,6	83,2
	bFeSSIF	0,048	0,40	226,4	202,5	263,3	234,0
	FeSSIF	0,060	0,38	181,2	162,0	210,6	187,2
	bFeSSIF/0,5% HPMC	0,130	0,39	83,6	74,8	97,2	86,4
	Aparatura 4	4 ml/min	0,420	0,87	25,9	23,1	30,1
8 ml/min		0,570	0,73	19,1	17,0	22,2	19,7

S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima oslobađanja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale, TS. Hipotetički input profili dobijeni korišćenjem različitih dekonvolucionih metoda, kao i eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja fitovani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Faktori skaliranja vremenske ose izračunati su kao odnos  $\tau_{d\text{vivo}}$  i  $\tau_{d\text{vitro}}$  (tabela 27). Može se uočiti da se vrednosti TS značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene metode dekonvolucije, kao i *in vitro* profila brzine rastvaranja i da variraju u veoma širokom rasponu od 17 do 263,3. Izuzetno visoke vrednosti TS mogli bi se objasniti izuzetno velikim volumenom distribucije, gde lekovita supstanca veoma brzo nakon dospevanja u sistemsku cirkulaciju prelazi u periferna tkiva. Iz tog razloga *in vivo* input profili ukazuju na veoma sporu i postupnu apsorpciju čije trajanje prevazilazi vreme zadržavanja leka u GI traktu.

Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom nakon korekcije vremenske ose prikazani su u tabeli 28. Visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisan vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0,95 dobijen je u svim ispitivanim slučajevima. Najbolja korelacija, odnosno vrednosti nagiba regresione prave približno broju jedan, kao i



visoka vrednost koeficijenta korelacije dobijena je kada su *in vitro* profili brzine rastvaranja poređeni sa profilom rastvaranja dobijenim GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa. Dobijeni rezultati potvrđuju da se pored konvencionalne farmakokinetičke analize, razvijeni *in silico* modeli mogu uspešno koristiti za identifikaciju *in vivo* input profila amlodipina, što predstavlja osnov za razvoj bioprediktivnih metoda za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja amlodipin-besilata i postavljanje klinički relevantnih specifikacija.

Tabela 28. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem amlodipin-besilata (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro input/ in vivo input</i>		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uređaj	Medijum/Protok					
Aparatura 2	bFaSSGF	<b>a</b>	1,0150	0,9836	0,8708	0,9738
		<b>r</b>	0,9976	0,9975	0,9973	0,9958
	FaSSGF	<b>a</b>	1,0183	0,9886	0,8777	0,9811
		<b>r</b>	0,9978	0,9984	0,9977	0,9967
	bFaSSIF	<b>a</b>	1,1043	1,0621	0,9412	1,0500
		<b>r</b>	0,9939	0,9912	0,9932	0,9897
	FaSSIF	<b>a</b>	1,1468	1,0943	0,9654	1,0651
		<b>r</b>	0,9924	0,9887	0,9901	0,9859
	bFeSSIF	<b>a</b>	0,9803	0,9590	0,8301	0,9346
		<b>r</b>	0,9780	0,9899	0,9866	0,9867
	FeSSIF	<b>a</b>	1,0184	0,9855	0,8654	0,9702
		<b>r</b>	0,9909	0,9972	0,9937	0,9939
	bFeSSIF/0,5% HPMC	<b>a</b>	1,1879	1,1360	1,0117	1,1228
		<b>r</b>	0,9906	0,9843	0,9885	0,9845
Aparatura 4	4 ml/min	<b>a</b>	0,9043	0,9210	0,8103	0,9977
		<b>r</b>	0,9816	0,9931	0,9915	0,9667
	8 ml/min	<b>a</b>	0,9511	0,9255	0,8313	1,0113
		<b>r</b>	0,9905	0,9908	0,9903	0,9516

**a** – nagib regresione prave; **r** – koeficijent korelacije

## Konvolucioni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije, profili koncentracije amlodipina u plazmi predviđeni primenom GI simulacije analizirani su u odnosu na srednji farmakokinetički profil uočen *in vivo* u studiji Faulkner i sar. (1986) za tablete sa trenutnim oslobađanjem.

Tabela 29. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem amlodipin-besilata primenom gastrointestinalne simulacije (konvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> profil		Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija		
Uređaj	Medijum/protok	<b>a</b>	<b>r</b>	<b>a</b>	<b>r</b>	
Aparatura 2	bFaSSGF	1,0217	0,9848	0,8933	0,9159	
		1,0212	0,9847	0,8916	0,9158	
	bFaSSIF	1,0159	0,9786	0,8898	0,9024	
		0,9930	0,9754	0,8811	0,8968	
	bFeSSIF	1,0231	0,9844	0,8906	0,9146	
		1,0285	0,9837	0,9054	0,9130	
	bFeSSIF/0,5% HPMC		0,9836	0,9777	0,8760	0,8942
	Aparatura 4	4 ml/min	1,0023	0,9706	0,8633	0,8896
8 ml/min		0,9981	0,9686	0,8702	0,8923	

**a** – nagib regresione prave; **r** – koeficijent korelacije

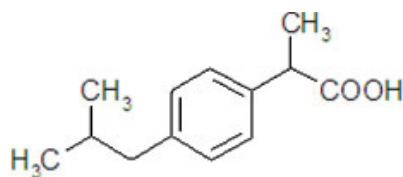
Statistički parametri linearne regresione analize za tablete sa trenutnim oslobađanjem amlodipin-besilata prikazani su u tabeli 29. Za razliku od podataka dobijenih primenom dekonvolucionog pristupa uspostavljanju IVIVK, analiza zasnovana na konvolucionom pristupu dala je nešto drugačije rezultate. Iz podataka prikazanih u tabeli 29 vidi se da je primenom konvolucione metode postignuta značajno bolja korelacija predviđenih i *in vivo* uočenih rezultata za sve *in vitro* profile brzine rastvaranja postignuta korišćenjem Simecyp® programskog paketa u poređenju sa GastroPlus™.

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta sa trenutnim oslobađanjem pokazali su da se u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FaSSGF i FeSSIF medijuma kao odgovarajućih medijuma bez lecitina i tauroholata, dobijaju profili koji odgovaraju brzom rastvaranju (više od 85% za 30 min) uz neznatni uticaj dodatka surfaktanata na brzinu rastvaranja. U medijumima pH vrednosti 6,5 (bFaSSIF i FaSSIF) zabeleženo je nešto sporije rastvaranje amlodipin-besilata, te je nakon 30 min rastvoreno oko 75% leka. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa baznim karakteristikama amlodipin-besilata gde se bolja rastvorljivost očekuje što je pH vrednost medijuma niža. Nešto sporije rastvaranje zabeleženo je i u viskoznom medijumu. U aparaturi sa protočnom ćelijom zabeleženo je značajno sporije rastvaranje amlodipin-besilata (nakon 30 min rastvoreno je tek oko 60% leka) reflektujući time značajno blažu hidrodinamiku aparature sa protočnom ćelijom u poređenju sa aparaturom sa lopaticom. Nije zabeležen uticaj brzine protoka medijuma na brzinu rastvaranja amlodipin-besilata.

Gastrointestinalnom simulacijom, na osnovu odabranih fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina amlodipina kao ulaznih podataka, dobijeni su profili koncentracije amlodipina u plazmi koji se dobro slažu sa *in vivo* uočenim vrednostima. Rezultati simulacija ukazuju da dobijeni *in vitro* profili brzine rastvaranja amlodipin-besilata iz tableta sa trenutnim oslobađanjem nemaju uticaja na rezultate GI simulacije ukoliko je minimum 60% leka rastvorno nakon 30 min. Dobijeni profili apsorpcije ukazuju na postepenu apsorpciju amlodipina, a predviđeni obim apsorpcije od oko 80% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti amlodipina nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem. Može se uočiti da u slučaju kada je više od 60% lekovite supstance rastvoreno nakon 30 min, nema značajnog uticaja brzine rastvaranja na apsorpciju amlodipina. Poređenjem rezultata simulacija korišćenjem dva programska paketa može se uočiti da su u GastroPlus™-u predviđene nešto više vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$  odnosno obima apsorpcije, te da su dobijene veće vrednosti procenta greške izabranih farmakokinetičkih parametara, što bi se moglo objasniti razlikama u PBPK modelima i njihovim osnovnim podešavanjima koje koriste ova dva paketa.

I dekonvolucioni i konvolucioni pristup potvrdili su visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisan vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0,95 za sve *in vitro* profile, ukazujući da se IVIVK korelacija dobija kada je rastvoreno više od 60% leka nakon 30 min, te bi se navedeno moglo smatrati klinički relevantnom specifikacijom u slučaju tableta sa trenutnim oslobađanjem amlodipin-besilata.

## 4.4 MODEL SUPSTANCA: IBUPROFEN



(RS)-2-(4-izobutil-fenil)propionska kiselina

Slika 41. Strukturna formula i hemijski naziv ibuprofena

Ibuprofen je dobro poznat i široko korišćeni nesteroidni antiinflamatorni lek. U preparatima je najčešće prisutan kao racemska smeša koja je neselektivni inhibitor ciklooksigenaze. Koristi se za lečenje reumatskih i nereumatskih bolesti mišićno-koštanog sistema. Posедуje i antipiretska svojstva (Davies, 1998). Maksimalna pojedinačna doza za odrasle je 800mg, dok je maksimalna dnevna doza 3200 mg. (Farmakoterapijski vodič, 2022). Detaljan pregled fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i biofarmaceutskih svojstava ibuprofena prikazan je u okviru odgovarajuće FIP Biowaiver monografije (Potthast i sar, 2005).

### 4.4.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva ibuprofena

Sa biofarmaceutskog aspekta ibuprofen pokazuje visoku permeabilnost i pH-zavisnu rastvorljivost u fiziološkom opsegu pH vrednosti, odnosno visoku rastvorljivost samo iznad određene pH vrednosti, te se svrstava u klasu 2 BCS, odnosno 2a podgrupu, ako se u obzir uzme i njegova slabo kisela priroda (pKa 4,5). Prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije lekova zasnovanom na dispoziciji lekova svrstava se takođe u klasu 2 s obzirom da podleže intenzivnom metabolizmu.

Osnovna rastvorljivost (*intrinsic solubility*) ibuprofena na 37°C iznosi 0,068 mg/ml (Levis i sar, 2003). Rastvorljivost ibuprofena u vodi na 37°C je 0,143 mg/ml (Kokot i Zmidzinska, 2001). Potthast i sar. (2005) ispitivali su rastvorljivost ibuprofena pri različitim pH vrednostima i pokazali da ona raste sa porastom pH vrednosti (tabela 31). Rastvorljivost ibuprofena menja se sa porastom temperature, pa su zabeležene znatno niže vrednosti na 20°C u poređenju sa 37°C. Rastvorljivost ibuprofena u humanom intestinalnom sadržaju u stanju na gladno iznosi 1,99 mg/ml (Heikkilä i sar, 2011). Literaturni podaci za rastvorljivost ibuprofena u fiziološki zasnovanim medijumima iznose 1,187 mg/ml u bFaSSIF, 1,756 mg/ml u FaSSIF, 0,216 mg/ml u bFeSSIF i 0,484 mg/ml u FeSSIF, što ukazuje na značajan uticaj fizioloških surfaktanata na rastvorljivost ibuprofena (Bard i sar, 2008). Takođe se može uočiti da vrednost rastvorljivosti u simuliranom intestinalnom medijumu odgovara vrednosti u humanom aspiratu.

Prividna permeabilnost ibuprofena određena na Caco-2 ćelijama iznosi  $53 \cdot 10^{-6}$  cm/s na osnovu koje ibuprofen takođe pripada grupi visoko permeabilnih lekovitih supstanci. Levis i sar. (2002) određivali su prividnu permeabilnost ibuprofena *in situ* perfuzionom tehnikom na pacovima korišćenjem različitih medijuma. Pokazali su da medijum koji je korišćen za ispitivanje može značajno uticati na vrednost prividne permeabilnosti koja se za ibuprofen kretala u opsegu 0,93 do  $1,4 \cdot 10^{-4}$  cm/s. Dobijeni rezultati takođe govore u prilog visoke permeabilnosti ibuprofena.

Nakon oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem, ibuprofen se veoma brzo apsorbuje dostižući maksimum koncentracije u plazmi nakon najkasnije 3 h od uzimanja leka. Literaturni podaci ukazuju na značajne razlike u obimu i brzini apsorpcije iz različitih farmaceutskih oblika (Davies, 1998). Apsorpcija ibuprofena nakon primene u vidu rastvora

značajno je brža ( $t_{max} < 0,25$  h) u poređenju sa primenom u vidu tableta ( $t_{max} = 2$  h) (Jamali i sar, 1992). Zabeležena je značajno niža vrednost  $C_{max}$  nakon primene ibuprofena u vidu suspenzije u poređenju sa rastvorom (Freidman i sar, 1990). Preparati sa produženim oslobađanjem pokazuju 3 do 6 puta niže vrednosti  $C_{max}$  i 4 do 12 h duže  $t_{max}$  u poređenju sa preparatima sa trenutnim oslobađanjem (Regazzi i sar, 1986; Kendall i sar, 1990; Zhao i Wang, 1995).  $\gamma$ -scintigrafijom pokazano je da se iz preparata sa produženim oslobađanjem ibuprofen jednako dobro apsorbuje duž celog GI trakta, a da se najveći procenat leka apsorbuje u debelom crevu (Parr i sar, 1987). Wilson i sar. (1989) su koristili istu metodu u ispitivanju apsorpcije ibuprofena nakon primene preparata sa produženim oslobađanjem na gladno, uz uzimanje laganog i kaloričnog doručka. Uočili su da je zadržavanje u želucu najduže nakon uzimanja kaloričnog doručka ( $> 15$  h). Takođe su zapazili da uzimanje leka na gladno rezultuje pojavom dva pika, koji se tek naziru kada se lek uzima sa laganim doručkom, dok se nakon uzimanja sa kaloričnim doručkom uočava samo drugi pik. Pojavu drugog pika nakon 12 do 14 h objasnili su raspadaњem tableta ibuprofena i visokom permeabilnošću u kolonu.

Prividni volumen distribucije iznosi 6,37 do 23,5 L, odnosno 0,1 do 0,2 L/kg što je okvirno jednako zapremini plazme i ukazuje da je akumulacija ibuprofena u tkivima zanemarljivo niska (Davies, 1998). Ibuprofen se intenzivno vezuje za proteine plazme, više od 98% leka u plazmi vezano je za albumine (Smith i sar, 1994). Vezivanje za proteine plazme uzrok je nelinearne farmakokinetike ibuprofena pri primeni visokih doza (Lockwood i sar, 1983; Gabard i sar, 1995).

R(-)-ibuprofen podleže hiralnoj inverziji u aktivni S(+)-ibuprofen (Oliary i sar, 1992; Geisslinger i sar, 1990). Nisu poznati drugi farmakološki aktivni metaboliti ibuprofena (Tan i sar, 2002). Metabolizam se najvećim delom odvija u jetri delovanjem citohrom P450 2C9 enzima pri čemu nastaju dva inaktivna metabolita (+)-2-4'-(2-hidroksi-2-metilpropil)fenilpropionska kiselina i (+)-2-4'-(2-karboksipropil)fenilpropionska kiselina, koji se potom izlučuju putem urina u slobodnom ili konjugovanom obliku (Leeman i sar, 1993). Urinom se izluči 70 do 90% primenjene doze, uglavnom u vidu metabolita ibuprofena. Oko 10% primenjene doze izlučuje se putem fecesa (Davies, 1998). Renalni klirens iznosi oko 1% (0,05 L/h) ukupnog klirensa u organizmu (Geisslinger i sar, 1993).

#### 4.4.2 *In vivo* podaci

Detaljnim pregledom *in vivo* studija dostupnih u literaturi za različite farmaceutske oblike ibuprofena, izabrani su profili koncentracije ibuprofena u plazmi koji će se koristiti kao referentni. U cilju biofarmaceutske karakterizacije korišćeni su literaturni podaci o koncentraciji ibuprofena u plazmi dobijeni nakon intravenske primene (Pavliv i Rock, 2009), oralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem (Lockwood i sar, 1983; Källström i sar, 1988) i preparata sa modifikovanim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa (Pargal i sar, 1996).

Pavliv i Rock (2009) ispitivali su farmakokinetiku, bezbednost i terapijsku efikasnost ibuprofena nakon primene intravenske bolus injekcije. Lockwood i sar. (1983) ispitivali su farmakokinetiku ibuprofena nakon primene četiri različite doze u vidu oralnog rastvora. Ustanovili su da se ibuprofen u svim slučajevima brzo i kompletno apsorbuje i da je farmakokinetika ibuprofena dozno-zavisna. Källström i sar. (1988) poredili su biološku raspoloživost ibuprofena nakon primene tri različita preparata sa trenutnim oslobađanjem. Pokazali su da se farmakokinetika ibuprofena značajno razlikuje u zavisnosti od primenjenog preparata, te se u terapiji preparati ne mogu zamenjivati jedan drugim. Pargal i sar. (1996) ispitivali su uticaj hrane na apsorpciju ibuprofena iz preparata sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa. Uočili su pojavu dvostrukog pika nakon primene leka na gladno. Uzimanje hrane nije značajno uticalo na biološku raspoloživost ibuprofena, iako je zabeleženo statistički značajno povećanje koncentracije prvog pika ( $C_{pik1}$ ).

Osnovni farmakokinetički parametri uočeni nakon primene izabranih farmaceutskih oblika ibuprofena prikazani su u tabeli 30. Na osnovu vrednosti parametara prikazanih u tabeli 30 može se zaključiti da apsorpcija ibuprofena pokazuje veliku varijabilnost u zavisnosti od primenjenog farmaceutskog oblika leka. S obzirom da pomenute razlike mogu usloviti i različite terapijske efekte, biofarmaceutska karakterizacija i *in vitro* i *in silico* modeli predviđanja apsorpcije ibuprofena iz različitih formulacija dobijaju sve veći značaj u svim fazama razvoja leka.

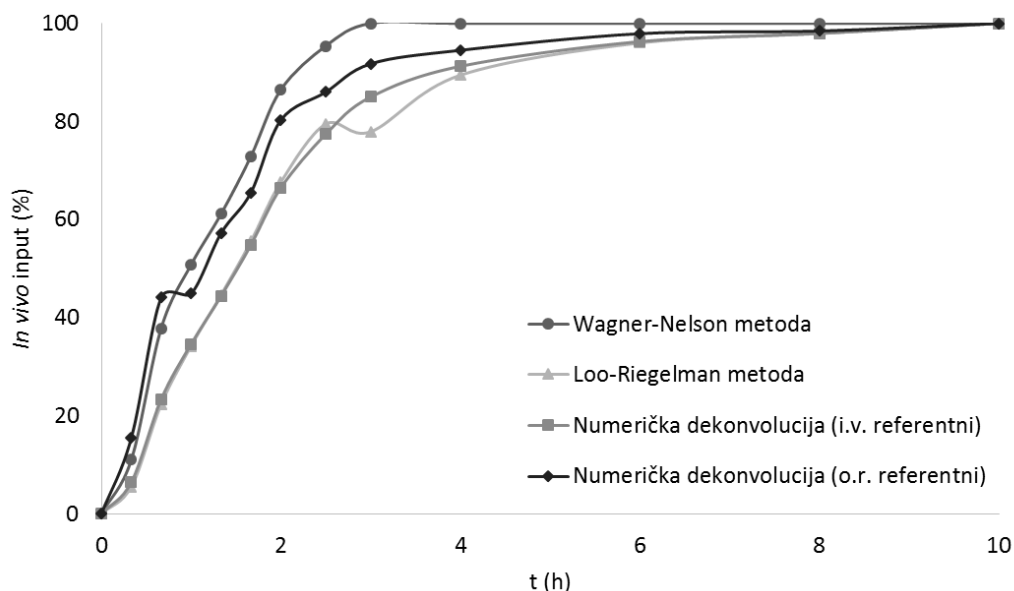
Tabela 30. Farmakokinetički parametri različitih farmaceutskih oblika ibuprofena

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> ±SD (µgh/ml)	C <sub>max</sub> ±SD (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> ±SD (h)	t <sub>max</sub> ±SD (h)	Referenca
i.v. bolus injekcija (800 mg)	196,0±37,0	120,0±13,0	2,0±0,5	/	Pavliv i Rock, 2009
Oralni rastvor (400 mg)	121,0±4,7	43,8±2,8	1,9±0,2	0,7±0,1	Lockwood i sar, 1983
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (600 mg)	221,3±48,5	44,9±12,2	2,2±0,3	2,1±0,6	Källström i sar, 1988
Hidrofilna matricna tableta sa produženim oslobađanjem (800 mg)	268,8±21,1	18,1±1,3 (C <sub>pik1</sub> =14,2±1,4 C <sub>pik2</sub> =15,1±1,9)	6,3±0,1	9,3±1,2 (t <sub>pik1</sub> =5,6±1,0 t <sub>pik2</sub> =17,4±1,3)	Pargal i sar, 1996

#### 4.4.3 Identifikacija i uporedna analiza hipotetičkih *in vivo* input profila ibuprofena dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

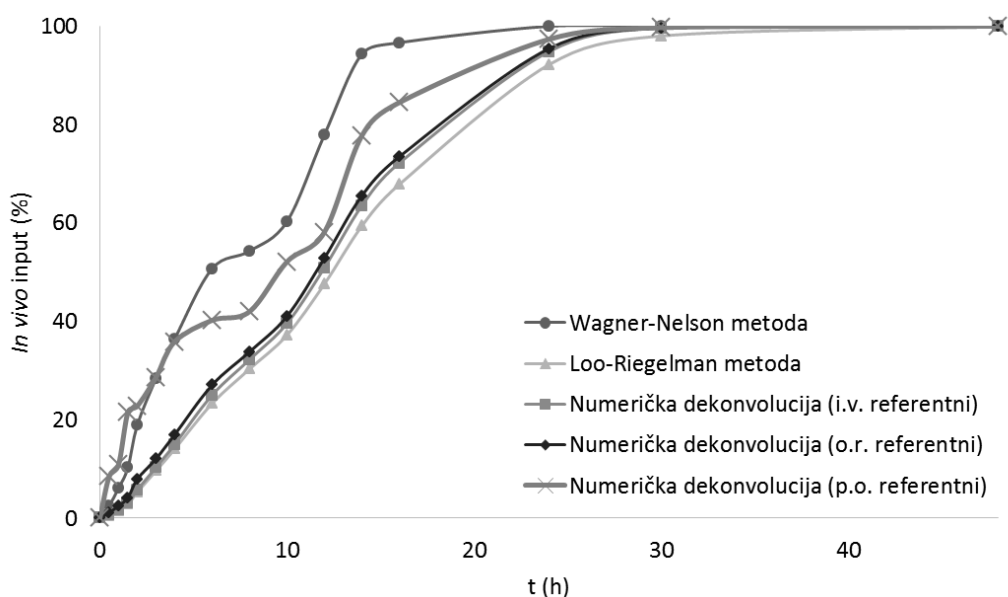
Poznavanje profila brzine rastvaranja i apsorpcije lekovite supstance iz preparata *in vivo* neophodno je da bi se razvila bioprediktivna i diskriminativna metoda za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta. Kako ti profili nisu direktno merljivi, primenjuju se različite metode konvencionalne farmakokinetičke analize kako bi se odredili na osnovu profila koncentracije leka u plazmi. U ovom istraživanju primenjene su Wagner-Nelson metoda, Loo-Riegelman metoda i numerička dekonvolucija na osnovu farmakokinetičkih podataka o intravenski i oralno primenjenim rastvorima, a u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem i numerička dekonvolucija na osnovu oralno primenjenog preparata sa trenutnim oslobađanjem, upotrebom softverskog paketa Kinetica 5.0.

*In vivo* input profili dobijeni na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene i primene oralnog rastvora korišćenih kao težinske funkcije za preparat sa trenutnim oslobađanjem (Källström i sar, 1988) prikazani su na slici 42. Može se uočiti da ne postoje značajne razlike između input profila dobijenih primenom različitih farmakokinetičkih metoda. Primenom Wagner-Nelson metode dobijen je profil apsorpcije ibuprofena koji pokazuje obim apsorpcije od 100% što odgovara literaturnim podacima o apsolutnoj biološkoj raspoloživosti ibuprofena (Davies, 1998; Parr i sar, 1987). Hipotetički *in vivo* profil dobijen ovom metodom ukazuje na nešto brže rastvaranje i apsorpciju u odnosu na profile dobijene drugim farmakokinetičkim metodama. Primenom Loo-Riegelman metode dobijen je input profil gotovo identičan profilu apsorpcije ibuprofena dobijenom numeričkom dekonvolucijom u odnosu na profil nakon intravenske primene. Zanimljivo je da, iako su ove dve metode zasnovane na različitim algoritmima, dobijeni rezultati su veoma slični i ukazuju na kompletnu apsorpciju ibuprofena. Numeričkom dekonvolucijom u odnosu na profil dobijen nakon primene oralnog rastvora dobijen je profil brzine rastvaranja ibuprofena *in vivo* koji ukazuje da je više od 85% lekovite supstance rastvoreno nakon 2,5 h.



Slika 42. Hipotetički *in vivo* input profili ibuprofena dobijeni primenom različitih farmakokinetičkih metoda za tablete sa trenutnim oslobađanjem (Källstrom i sar, 1998)

*In vivo* input profili dobijeni Wagner-Nelson metodom, Loo-Riegelman metodom, i numeričkom dekonvolucijom, na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene, primene oralnog rastvora i primene preparata sa trenutnim oslobađanjem korišćenih kao težinske funkcije za preparat sa produženim oslobađanjem (Pargal i sar, 1996) prikazani su na slici 43.



Slika 43. Hipotetički *in vivo* input profili ibuprofena izračunati primenom različitih farmakokinetičkih metoda za tablete sa produženim oslobađanjem (Pargal i sar, 1996)

Profil dobijen Wagner-Nelson metodom ukazuje na brže rastvaranje i apsorpciju u odnosu na profile dobijene drugim farmakokinetičkim metodama, kao i na potpunu apsorpciju ibuprofena nakon 16 h. Hipotetički *in vivo* profil dobijen ovom metodom takođe ukazuje da se više od 50% leka apsorbovalo u tankom crevu što nije u saglasnosti sa literaturnim podacima u kojima se navodi da se najveći procenat leka iz preparata sa produženim oslobađanjem apsorbuje u debelom crevu (Parr i sar, 1987). Primenom Loo-Riegelman metode dobijen je hipotetički *in*

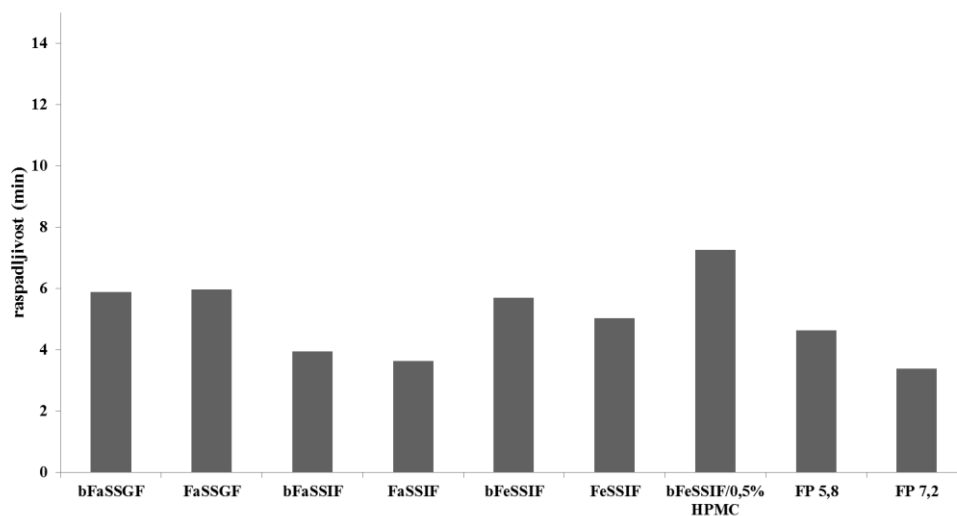
*vivo* profil apsorpcije koji je gotovo identičan profilu apsorpcije dobijenom numeričkom dekonvolucijom u odnosu na profil nakon intravenske primene. Ovi profili ukazuju na sporiju apsorpciju od one predviđene Wagner-Nelson metodom, kao i da se najveći procenat leka apsorbuje po prelasku u debelo crevo. Numeričkom dekonvolucijom gde su kao težinske funkcije primenjeni plazma profili nakon primene oralnog rastvora i preparata sa trenutnim oslobađanjem dobijeni su profili brzine rastvaranja ibuprofena *in vivo* koji ukazuju na potpuno rastvaranje ibuprofena nakon 24 h. Profil dobijen u odnosu na preparat sa trenutnim oslobađanjem ukazuje na nešto brže rastvaranje ibuprofena.

#### 4.4.4 *In vitro* ispitivanja

Ispitivanje raspadljivosti sprovedeno je u cilju ispitivanja uticaja različitih medijuma na raspadljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena i njegovog uticaja na brzinu rastvaranja ibuprofena iz tableta. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja ibuprofena iz komercijalno dostupnog preparata sa trenutnim oslobađanjem (I1) i preparata sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa (I2) i lipofilnog matriksa (I3) (kvalitativni sastav tableta naveden je u okviru Priloga 1) sprovedeno je u cilju razmatranja uticaja različitih eksperimentalnih uslova: vrste i sastava medijuma, tipa aparature, kao i hidrodinamičkih uslova na kinetiku rastvaranja ibuprofena. Kao medijumi za ispitivanje korišćeni su: vodeni medijumi različitih pH vrednosti (voda, fosfatni pufer pH 5,8 (FP 5,8), fosfatni pufer pH 7,2 (FP 7,2), fosfatni pufer pH 6,5 (FP 6,5)), viskozni medijum (0,5% HPMC u bFeSSIF), kao i fiziološki zasnovani medijumi (FaSSGF, FaSSIF, FeSSIF i njihovi prazni puferi). U ispitivanjima brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa produženim oslobađanjem korišćena je i izmena medijuma: 15 min bFaSSGF / 3 h bFaSSIF / 9 h SCoF. Ispitivanje brzine rastvaranja iz komercijalno dostupnih tableta sprovedeno je u četiri različite aparature: aparaturi sa lopaticom (aparatura 2), aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem (aparatura 3), aparaturi sa protočnom ćelijom (aparatura 4) i aparaturi sa staklenim kuglicama (aparatura K), uz variranje hidrodinamičkih uslova.

#### Raspadljivost tableta

Raspadljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena u različitim medijumima prikazana su na slici 44. Može se uočiti da se tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena raspadaju relativno brzo (između 3 i 8 min) i da vrsta medijuma, uključujući i viskozni medijum, ne utiče značajno na vreme raspadanja tableta.

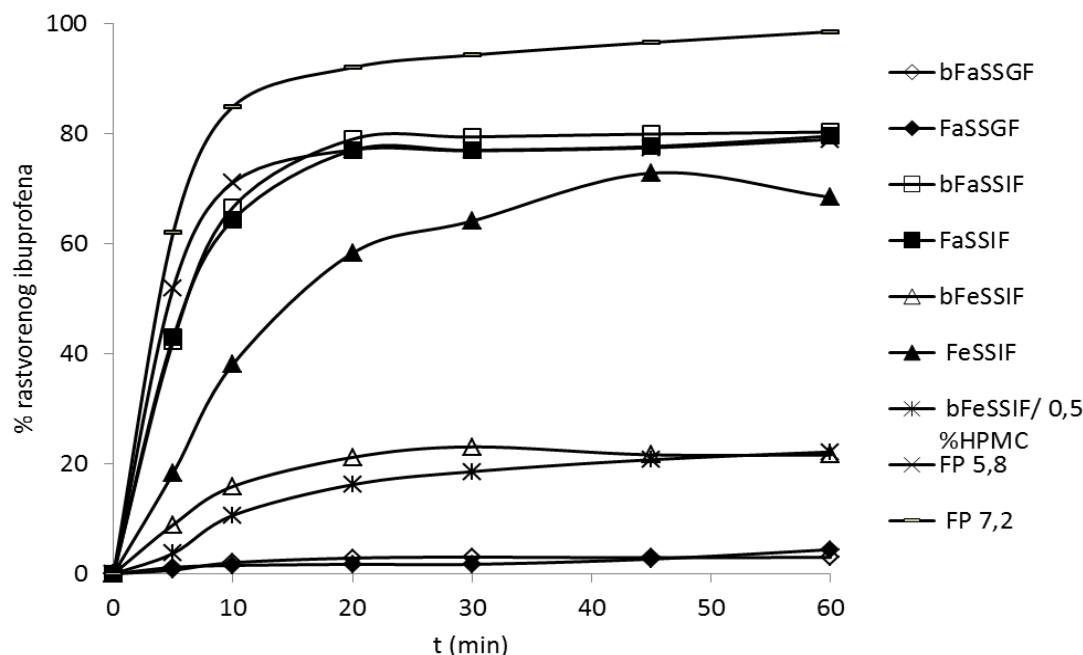


Slika 44. Raspadljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena (I1) u različitim medijumima

## Brzina rastvaranja ibuprofena iz tableta

### Tablete sa trenutnim oslobađanjem (preparat I1)

Ekperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem u aparaturi sa lopaticom u različitim medijumima prikazani su na slici 45.



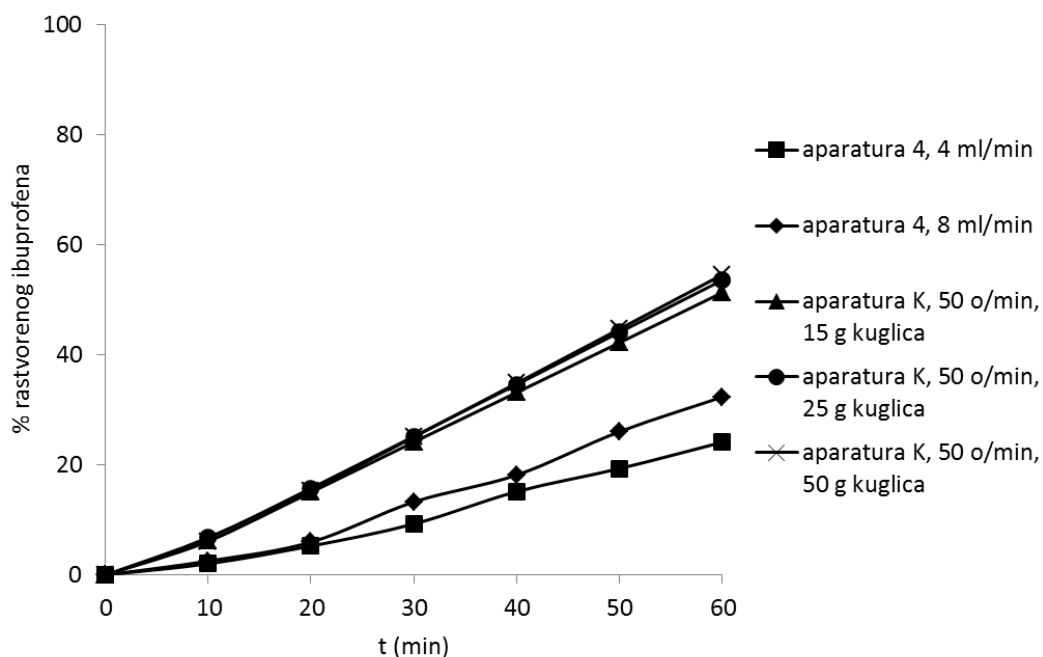
Slika 45. Profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (preparat I1) u različitim medijumima u aparaturi sa lopaticom

Ibuprofen pokazuje kiseli karakter, pKa vrednost iznosi 4,5 (Higgins i sar, 2001), te je gotovo nerastvorljiv u medijumima pH vrednosti 1,6 (odnosno bFaSSGF i FaSSGF) dok pri vrednostima pH 5,0 ima ograničenu rastvorljivost, 0,216 mg/ml u bFeSSIF (Bard i sar, 2008), čime se može objasniti veoma nizak procenat rastvorenog ibuprofena kada su u eksperimentima korišćeni ovi medijumi. Dodatak HPMC-a nije imao značajnog uticaja na brzinu rastvaranja ibuprofena. U FeSSIF-u je brzina rastvaranja ibuprofena značajno veća u poređenju sa bFeSSIF-om, te je 75% ibuprofena rastvoreno nakon 45 min, što se može objasniti micelarnom solubilizacijom i povećanjem rastvorljivosti ibuprofena u prisustvu fizioloških surfaktanata (Bard i sar, 2008). Očigledno je da je, u datom slučaju, pozitivan uticaj fizioloških surfaktanata na rastvorljivost lekovite supstance veći od negativnog uticaja smanjenog difuziteta micela sa lekovitom supstancom na profil brzine rastvaranja. U bFaSSIF-u, FaSSIF-u, i fosfatnim puferima pH vrednosti 5,8 i 7,2 zabeleženo je značajno brže rastvaranje ibuprofena, s tim što je u slučaju fosfatnog pufera pH 7,2 profil odgovara veoma brzom rastvaranju (više od 85% nakon 15 min), dok je u slučaju bFaSSIF-a, FaSSIF-a i fosfatnog pufera pH 5,8 nakon 20 min rastvoreno 80% ibuprofena kada je postignut plato. Ovakvi rezultati reflektuju razlike u rastvorljivosti ibuprofena pri različitim pH vrednostima (Potthast i sar, 2005).

Na slici 46 prikazani su uporedno profili brzine rastvaranja ibuprofena kada je korišćena izmena medijuma (15 min bFaSSGF/45 min bFaSSIF) u aparaturi sa protočnom ćelijom (aparatura 4) i aparaturi sa staklenim kuglicama (aparatura K) pri različitim hidrodinamičkim uslovima. U aparaturi sa protočnom ćelijom ukupna zapremina medijuma upotrebljena u ispitivanju iznosila je 240 ml za 60 min ispitivanja pri protoku 4 ml/min, odnosno 480 ml za 60 min pri protoku 8 ml/min. Ibuprofen se rastvara sporo, te je nakon 60 min ispitivanja rastvoreno tek oko 20% ibuprofena pri protoku 4 ml/min, odnosno 30% pri protoku 8 ml/min. Ovakvi



rezultati reflektuju relativno malu zapreminu medijuma koja je upotrebljena u ispitivanju, kao i blagu hidrodinamiku aparature sa protočnom ćelijom pri upotrebljenim brzinama protoka medijuma.



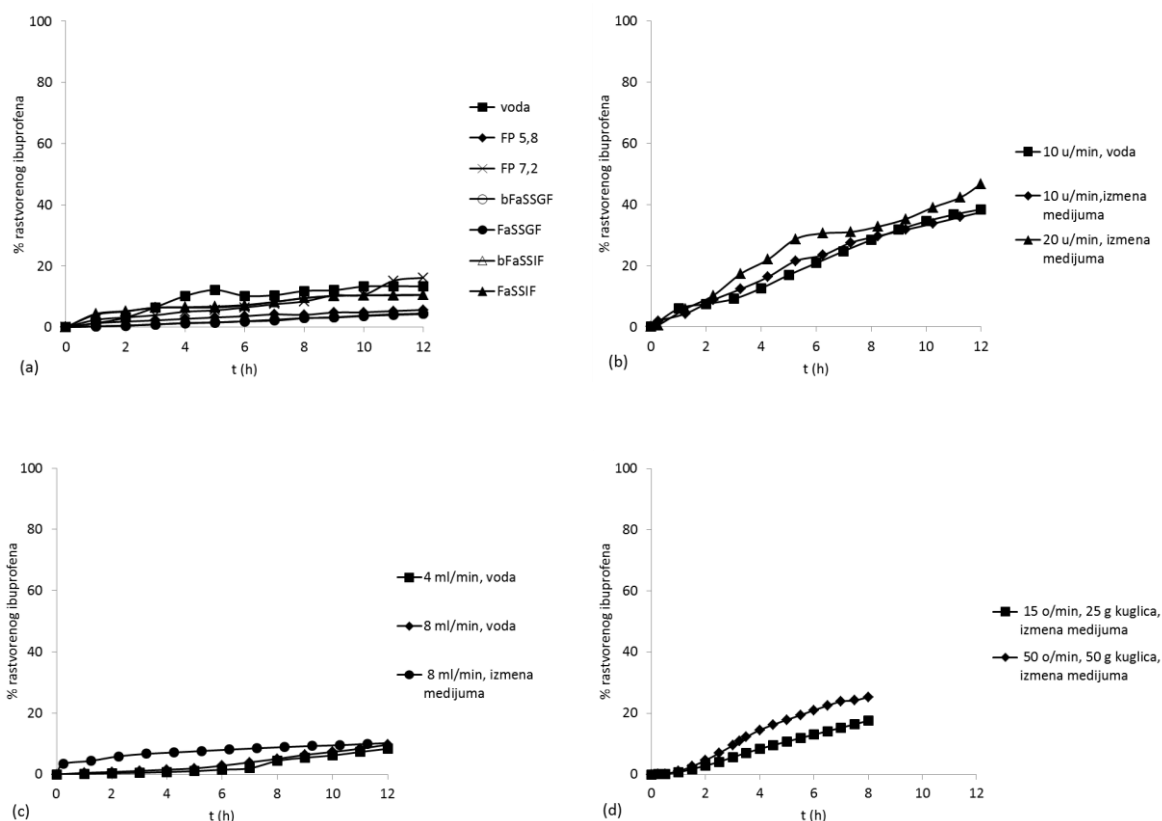
Slika 46. Profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (preparat I1) uz izmenu medijuma (15 min bFaSSGF/45 min bFaSSIF) u aparaturi sa protočnom ćelijom i aparaturi sa kuglicama

U aparaturi sa staklenim kuglicama uočeno je značajno brže rastvaranje ibuprofena u poređenju sa protočnom ćelijom (55% ibuprofena rastvoreno je za 60 min) iako je upotrebljen niži protok medijuma (2 ml/min), pa je zapremina medijuma koja je korišćena u ispitivanju značajno niža (120 ml). U ovom uređaju okretanje magneta pokreće staklene kuglice koje svojim delovanjem obezbeđuju intenzivniju hidrodinamiku, brže raspadanje tableta i rastvaranje ibuprofena. Može se uočiti da variranje količine kuglica nije značajno uticalo na brzinu rastvaranja ibuprofena.

### Tablete sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa (I2)

Profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa primenom različitih eksperimentalnih uslova prikazani su na slici 47. Na slici 47a prikazani su profili dobijeni u aparaturi sa lopaticom uz primenu različitih medijuma. Može se uočiti da je, bez obzira na upotrebljeni medijum, rastvaranje ibuprofena u aparaturi sa lopaticom veoma sporo i ukupna količina rastvorenog ibuprofena nakon 12 sati ispitivanja manja je od 20%. Ovakvi rezultati mogli bi se objasniti ograničenom zapreminom medijuma u aparaturi sa lopaticom, ali i sporim bubrenjem ksantan gume (koja je upotrebljena kao sredstvo za formiranje matriksa) na koje pH vrednost medijuma nema značajnog uticaja. Kako bi se sagledao uticaj hidrodinamike i zapremine medijuma na kinetiku rastvaranja ibuprofena iz preparata sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa primenjene su i druge aparature za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta. Ispitivanjem u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem (slika 47b) dobijeni su linearni profili brzine rastvaranja, i u slučaju kada je upotrebljeno 10 uranjanja u minuti (u oba ispitivana medijuma) rastvoreno je 35% nakon 12 h, dok je pri 20 uranjanja u minuti rastvoreno 45% nakon 12 h ispitivanja, odnosno 87% nakon 24 h. U slučaju kada je upotrebljena intenzivnija hidrodinamika (20 uranjanja u minuti) primećeno je delimično raspadanje tableta nakon 5 h ispitivanja, čime bi se moglo objasniti izvesno

odstupanje od linearnog profila u tom vremenskom intervalu. Ovakva zapažanja odgovaraju rezultatima *in vivo* ispitivanja  $\gamma$ -scintigrafijom u kojima je zabeleženo raspadanje matriks tableta sa produženim oslobađanjem nakon prelaska u kolon (Wilson i sar, 1989).



Slika 47. Profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa (preparat I2) u (a) aparaturi sa lopaticom, (b) aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem, (c) aparaturi sa protočnom ćelijom, (d) aparaturi sa staklenim kuglicama, u različitim medijumima i pri različitim hidrodinamičkim uslovima

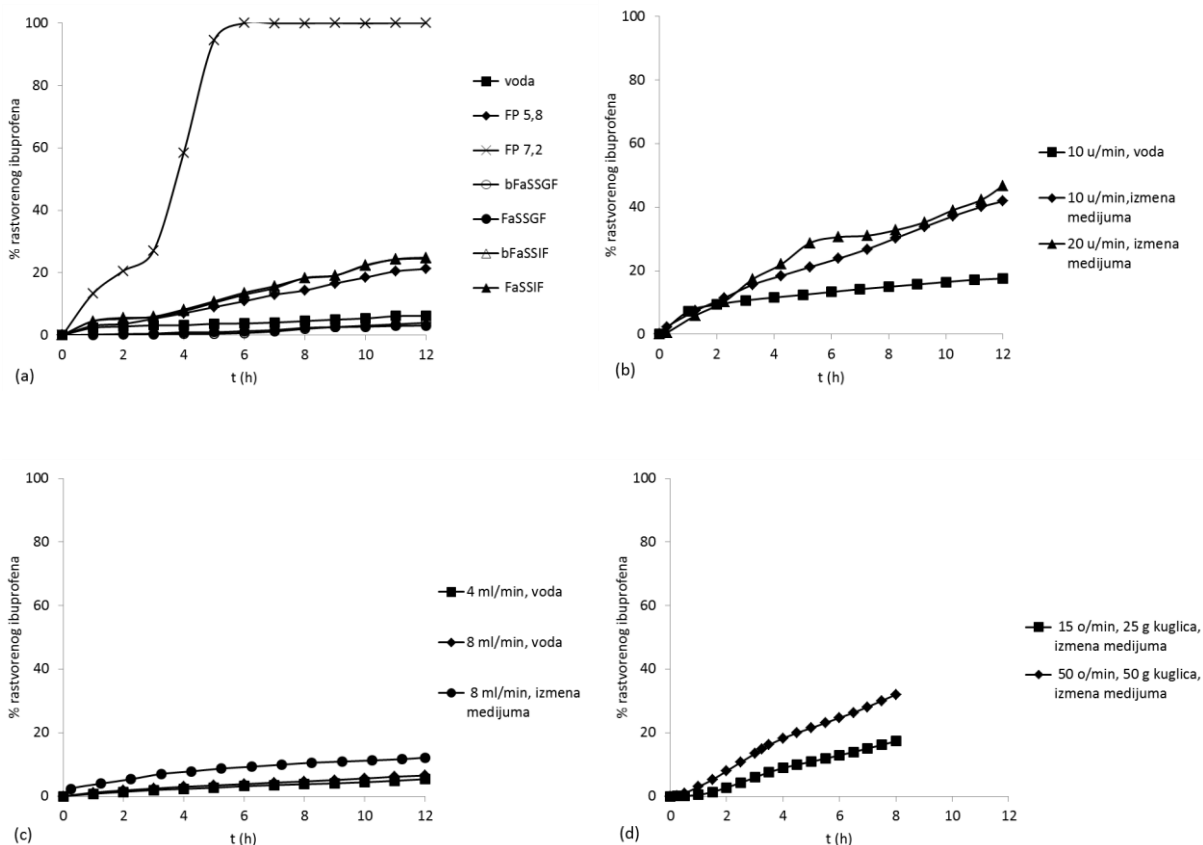
U aparaturi sa protočnom ćelijom profili brzine rastvaranja ibuprofena u vodi pokazuju početno vreme odlaganja (*lag time*) od 6 h, praćeno veoma sporim rastvaranjem ibuprofena (slika 47c). U slučaju kada je korišćena izmena medijuma nije zabeleženo vreme odlaganja, ali su i u ovom slučaju veoma blagi hidrodinamički uslovi u protočnoj ćeliji čak i pri protoku 8 ml/min (Gao, 2009) usloveli veoma sporo rastvaranje ibuprofena.

U aparaturi sa staklenim kuglicama profili brzine rastvaranja inicijalno pokazuju fazu odlaganja od 1 h, nakon čega je pri korišćenju eksperimentalne postavke 15 o/min i 25 g kuglica oslobođeno 18% ibuprofena nakon 8 h ispitivanja, odnosno pri korišćenju 50 o/min i 50 g kuglica 25% ibuprofena nakon 8 h (slika 47d). Može se uočiti značajan uticaj intenziteta agitacije u aparaturi sa staklenim kuglicama na brzinu rastvaranja ibuprofena iz preparata tipa hidrofilnog matriksa.

### Tablete sa produženim oslobađanjem tipa lipofilnog matriksa (I3)

Ispitivanje brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa produženim oslobađanjem tipa lipofilnog matriksa ukazalo je na značajne razlike u profilima brzine rastvaranja u zavisnosti od primenjenih eksperimentalnih uslova. Dobijeni profili prikazani su na slici 48. U aparaturi sa lopaticom (slika 48a), u vodi i medijumima pH vrednosti 1,6 (bFaSSGF i FaSSGF) rastvoreno je manje od 10% ibuprofena nakon 12 h. Nešto brže rastvaranje uočeno je u fosfatnom puferu pH

5,8 i fiziološki zasnovanim medijumima bFaSSIF i FaSSIF kada je za 12 h rastvoreno oko 20% ibuprofena. Nije zabeležen uticaj fizioloških surfaktanata na brzinu rastvaranja ibuprofena iz lipofilnog matriks sistema. U fosfatnom puferu pH 7,2 inicijalno relativno sporo rastvaranje praćeno je naglim skokom, te je zabeleženo potpuno rastvaranje ibuprofena nakon 6 h. Može se uočiti da je brzina rastvaranja ibuprofena iz tableta tipa lipofilnog matriksa u aparaturi sa lopaticom ograničena pH-zavisnom rastvorljivošću ibuprofena (Potthast i sar, 2005). Kako bi se sagledao uticaj hidrodinamike i zapremine medijuma na rastvaranje ibuprofena iz tableta tipa lipofilnog matriksa, primenjene su i aparatura sa cilindrom sa povratnim kretanjem, aparatura sa protočnom ćelijom i aparatura sa staklenim kuglicama.



Slika 48. Profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa produženim oslobađanjem tipa lipofilnog matriksa (preparat I3) u (a) aparaturi sa lopaticom, (b) aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem, (c) aparaturi sa protočnom ćelijom, (d) aparaturi sa staklenim kuglicama, u različitim medijumima i pri različitim hidrodinamičkim uslovima

Korišćenje vode kao medijuma u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem pri 10 uranjanja u minuti uslovalo je veoma sporo rastvaranje ibuprofena (slika 48b) i nakon 12 h ispitivanja rastvoreno je 15% ibuprofena. Ovakav rezultat u saglasnosti je sa literturnim podacima o rastvorljivosti ibuprofena u vodi. Korišćenje izmene medijuma pri istom broju uranjanja u minuti dovelo je do značajno bržeg rastvaranja ibuprofena (38% nakon 12 h ispitivanja). Intenzivnija hidrodinamika pri korišćenju 20 uranjanja/min uslovala je nešto brže rastvaranje ibuprofena i to 45% nakon 12 h, odnosno 86% nakon 24 h, s tim što se javlja odstupanje od linearnog profila oko 5 h. Kao i u slučaju hidrofилnih matriks tableta u slučaju kada je korišćena intenzivnija hidrodinamika primećeno je delimično raspadanje tableta čime bi se ovo odstupanje moglo objasniti.

Primenjeni hidrodinamički uslovi u aparaturi sa protočnom ćelijom bili su isuviše blagi da bi obezbedili odgovarajuće rastvaranje ibuprofena s obzirom da je ukupna količina rastvorenog ibuprofena bila manja od 10% nakon 12 h ispitivanja (slika 48c).

U aparaturi sa staklenim kuglicama različiti intenziteti agitacije uslovili su razlike u profilima brzine rastvaranja. U oba slučaja uočena je inicijalna faza odlaganja od 1 h, ali je pri korišćenju 15 obrtaja/min i 25 g kuglica rastvoreno 18% nakon 8 h ispitivanja, a u slučaju kada je korišćeno 50 obrtaja/min i 50 g kuglica 35% (slika 48d).

Uporedna analiza profila brzine rastvaranja ibuprofena iz ispitivanih preparata sa produženim oslobađanjem, pokazala je da se slični profili brzine rastvaranja dobijaju u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem pri 20 uranjanja u minuti, kao i aparaturi sa staklenim kuglicama u slučaju kada je korišćeno 50 obrtaja/min i 50 g kuglica. Navedeni dinamički uređaji za ispitivanje brzine rastvaranja, pokazali su prednost u odnosu na konvencionalnu aparaturu sa lopaticom kada je u pitanju razvoj bioprediktivne i diskriminativne metode za ispitivanje brzine rastvaranja.

#### 4.4.5 *In silico* ispitivanja

U okviru ovog poglavlja biće opisani razvoj i validacija *in silico* modela za simulaciju apsorpcije ibuprofena iz različitih farmaceutskih oblika korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> i GastroPlus<sup>™</sup> programskih paketa sa ciljem mehanističke interpretacije apsorpcije ibuprofena iz različitih farmaceutskih oblika i identifikacije bioprediktivne metode za ispitivanje brzine rastvaranja.

##### 4.4.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> programskog paketa

Simulacija apsorpcije ibuprofena iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa Simcyp<sup>®</sup> *Population-Based Simulator* (verzija 13.2, Certara<sup>™</sup>, SAD). Profil koncentracije ibuprofena u plazmi simuliran je na osnovu fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 31, čije su vrednosti preuzete iz literature ili su *in silico* predviđene. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim, odnosno produženim oslobađanjem korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. U cilju validacije modela korišćeni su srednji profili koncentracije ibuprofena u plazmi iz studija Källström i sar. (1988) za tablete sa trenutnim oslobađanjem, odnosno Pargal i sar. (1996) za tablete sa produženim oslobađanjem.

Kao apsorpcioni model u svim simulacijama korišćen je ADAM model. Ibuprofen u fiziološkom opsegu pH vrednosti pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost, te je u simulacijama korišćen pH-zavistan profil rastvorljivosti iz studije Potthast i sar. (2005). Vrednost efektivne permeabilnosti izračunata je na osnovu permeabilnosti dobijene *in situ* perfuzijom GI trakta pacova (Levis i sar, 2003) korišćenjem jednačine Fagerholm i sar. (1996):

$$p_{eff,ljudi} = 3,6 \cdot p_{eff,pacova} + 0,03 \cdot 10^{-4}. \quad [\text{jednačina 6}]$$

Dobijena je relativno visoka vrednost efektivne permeabilnosti ( $3,52 \cdot 10^{-4}$  cm/s) što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o brzini i potpunoj apsorpciji ibuprofena iz GI trakta (Davies, 1998). Scintigrafske studije na ljudima ukazuju da se ibuprofen iz preparata sa produženim oslobađanjem apsorbuje duž celog GI trakta (Parr i sar, 1987) što je takođe u saglasnosti sa visokom permeabilnošću ibuprofena. Volumen distribucije predviđen je u Simcyp<sup>®</sup>-u na osnovu *potpuni* PBPK modela distribucije i metode Rodgers i Rowland (metoda 2) i iznosi 0,1 L/kg što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Davies, 1988). Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi preuzet je iz studije Obach (1999), a vrednost slobodne frakcije

leka u plazmi iz studije Brocks i Jamali (1999). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

Tabela 31. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije ibuprofena

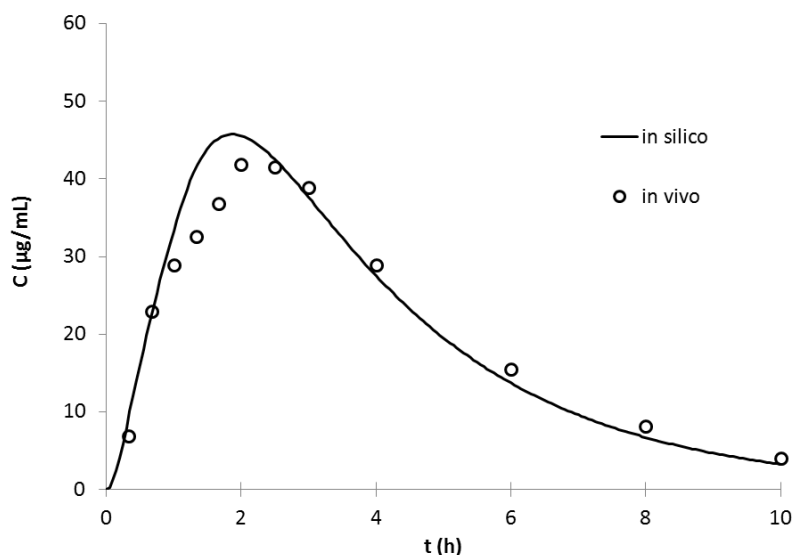
Parametar (jedinica mere)	Vrednost	
Molekulska masa (g/mol)	206,3	
logP <sub>o:w</sub>	3,68 <sup>a</sup>	
Jednobazna kiselina		
pKa	4,5 <sup>b</sup>	
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	0,55 <sup>c</sup>	
Slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub>	0,01 <sup>d</sup>	
Apsorpcija		
ADAM model		
Efektivna permeabilnost, P <sub>eff</sub> (cm/s)	3,52·10 <sup>-4</sup> <sup>e</sup>	
pH-zavisni profil rastvorljivosti (mg/ml)	0,038 na pH 1,0 <sup>f</sup> 0,043 na pH 3,0 <sup>f</sup> 0,084 na pH 4,5 <sup>f</sup> 0,685 na pH 5,5 <sup>f</sup> 3,370 na pH 6,8 <sup>f</sup> 3,340 na pH 7,4 <sup>f</sup>	
Vreme zadržavanja u kolonu (h)	12 <sup>g</sup>	(15,8 <sup>h</sup> )
Konstanta precipitacije (h <sup>-1</sup> )	4 <sup>g</sup>	
Radius čestica lekovite supstance (μm)	10 <sup>g</sup>	
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>g</sup>	
Distribucija		
Potpuni PBPK model, metoda 2		
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, V <sub>ss</sub> (L/kg)	0,1 <sup>i</sup>	
Eliminacija		
CL <sub>po</sub> (L/h)	2,9 <sup>j</sup>	(1,8 <sup>h</sup> )
Dizajn studije		
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije		
Doza (mg)	600	(800)
Vreme simulacije (h)	24	(48)
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250	

Vrednosti navedene u zagradi odnose se na razvoj modela za preparate sa modifikovanim oslobađanjem

<sup>a</sup> Podatak iz literature (Kasim i sar, 2004); <sup>b</sup> Podatak iz literature (Higgins i sar, 2001); <sup>c</sup> Podatak iz literature (Obach, 1999); <sup>d</sup> Podatak iz literature (Brocks i Jamali, 1999); <sup>e</sup> Objašnjeno u tekstu; <sup>f</sup> Podatak iz literature (Potthast i sar, 2005); <sup>g</sup> Simcyp<sup>®</sup> vrednost; <sup>h</sup> Predviđena vrednost korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> Parameter Estimation opcije; <sup>i</sup> Vrednost izračunata u Simcyp<sup>®</sup>-u korišćenjem Potpuni PBPK modela distribucije; <sup>j</sup> Podatak iz literature (Lockwood i sar, 1983)

## Razvoj i validacija modela za preparate sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena

Gastrointestinalna simulacija apsorpcije ibuprofena korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> programa započeta je razvojem i validacijom modela za tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena (TO model). Kao ulazni parametri za simulaciju korišćeni su podaci prikazani u tabeli 31. Simulirani profil koncentracije ibuprofena u plazmi bio je u saglasnosti sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Källström i sar, 1988), što je prikazano na slici 49.



Slika 49. Simulirani profil koncentracije ibuprofena u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na *in vivo* profil

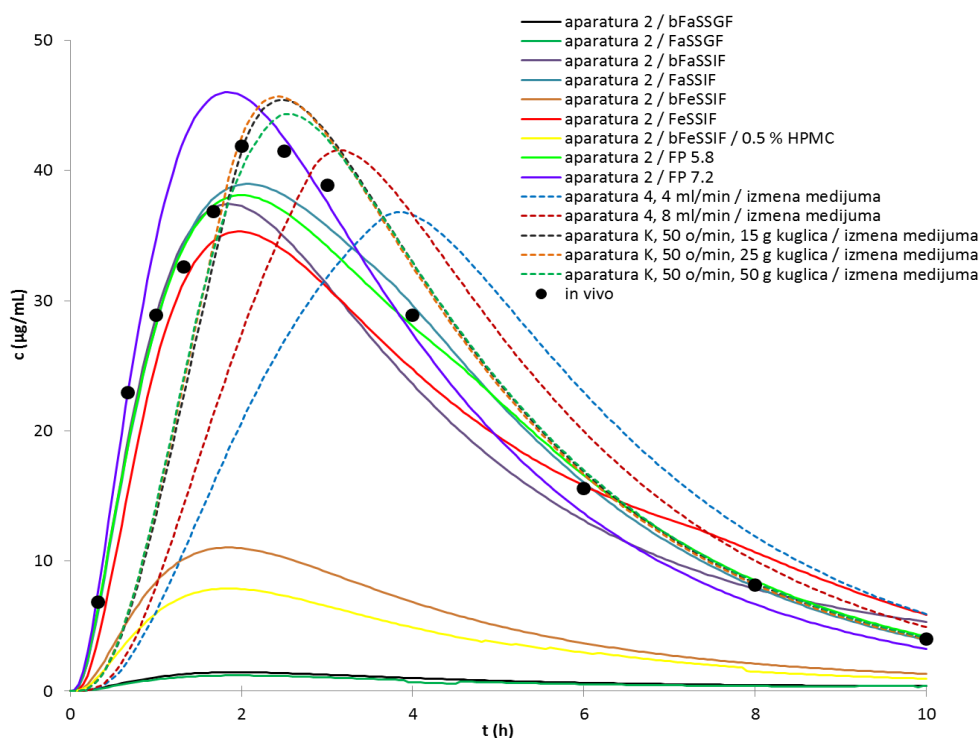
Tačnost predviđanja procenjena je izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), prikazanih u tabeli 32, i s obzirom da njihove vrednosti ne prelaze 10%, model se smatra validiranim i kao takav korišćen je za dalja ispitivanja.

Tabela 32. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih greški predviđanja za tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena

Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{max}$ (µg/ml)	41,85	45,76	9,34
$t_{max}$ (h)	2,00	1,90	5,00
$PIK_{0-t}$ (µgh/ml)	191,50	201,98	5,47

Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije kako bi se ispitaio uticaj brzine rastvaranja na profil koncentracije ibuprofena u plazmi u funkciji vremena. Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 50. Dobijeni profili ukazuju da na rezultate GI simulacije značajno utiču ulazni *in vitro* profili brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta. Na osnovu prikazanih profila može se uočiti da se preciznije predviđanje koncentracije ibuprofena u plazmi dobija ukoliko se koriste *in vitro* profili brzine rastvaranja u kojima je više od 80% ibuprofena rastvoreno nakon 20 minuta, odnosno profili dobijeni u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje bFaSSIF, FaSSIF, fosfatnog pufera pH 5,8 i pH 7,2 kao medijuma.

Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), dobijenih na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 33. Na osnovu prikazanih rezultata, može se zapaziti da se najveća sličnost između simuliranog i stvarnog profila koncentracije ibuprofena u plazmi može se uočiti u slučaju kada su kao ulazni profili korišćeni eksperimentalno određeni profili brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje bFaSSIF, FaSSIF, fosfatnog pufera pH 5,8 i pH 7,2 kao medijuma. Odlična predviđanja obima i brzine apsorpcije ibuprofena dobijena su i korišćenjem profila dobijenih u aparaturi sa staklenim kuglicama uz izmenu medijuma.



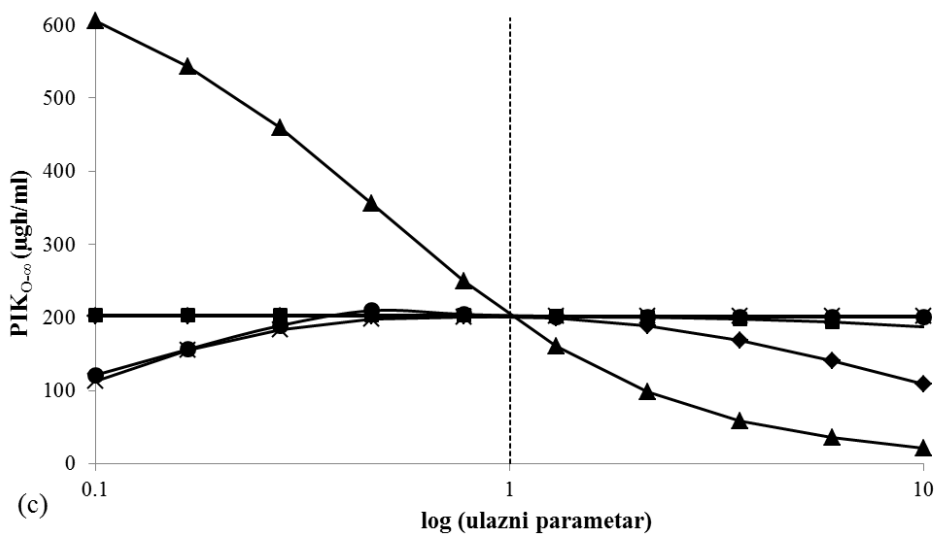
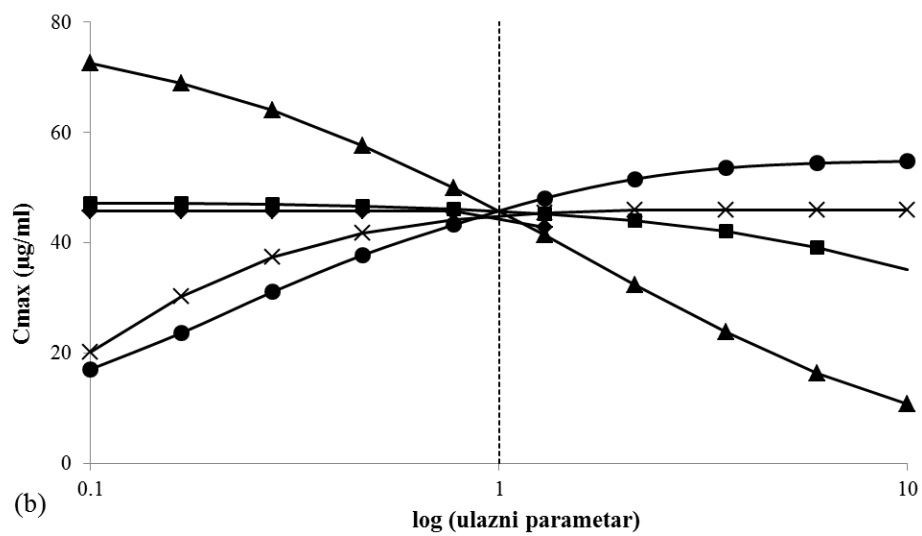
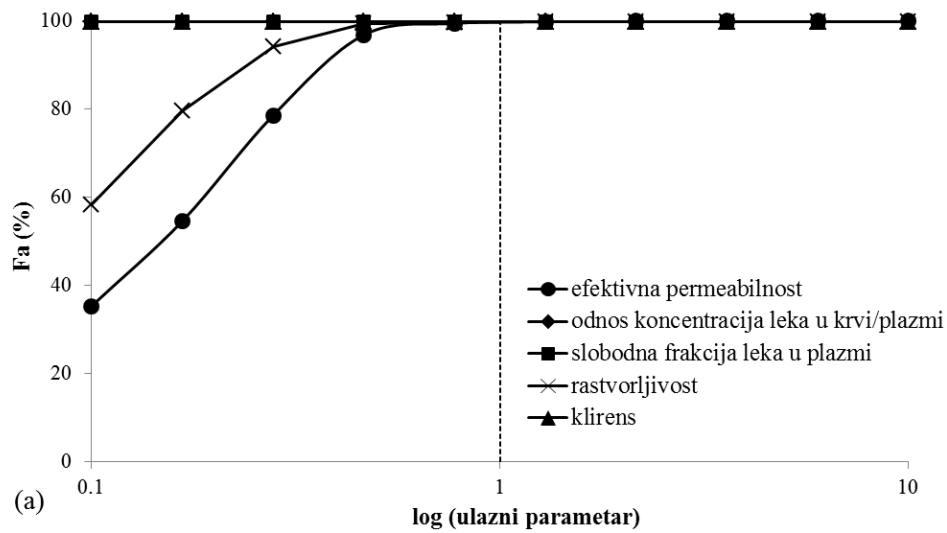
Slika 50. Simulirani profili koncentracije ibuprofena u plazmi na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja (preparat II) zajedno sa *in vivo* uočenim profilom

Tabela 33. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem i odgovarajuće greške predviđanja

<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/Hidro dinamika	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
Aparatura 2	bFaSSGF	1,45	96,53	1,95	2,50	7,84	95,90
	FaSSGF	1,42	96,60	1,95	2,50	7,80	95,92
	bFaSSIF	37,44	10,53	1,90	5,00	178,95	6,55
	FaSSIF	39,00	6,81	2,05	2,50	198,00	3,39
	bFeSSIF	11,00	73,71	1,85	7,50	51,30	73,21
	FeSSIF	35,30	15,65	1,95	2,50	186,30	2,71
	bFeSSIF/0,5% HPMC	10,20	75,62	1,80	10,00	47,20	75,35
	FP 5,8	38,10	8,96	2,00	0,00	194,71	1,67
	FP 7,2	46,01	9,94	1,90	5,00	201,96	5,46
Aparatura 4	4 ml/min	36,80	12,06	3,85	92,50	188,40	1,61
	8 ml/min	41,60	0,59	3,15	57,50	194,14	1,37
Aparatura K	50 o/min, 15 g kuglica	45,40	8,48	2,45	22,50	198,60	3,70
	50 o/min, 25 g kuglica	45,70	9,19	2,45	22,50	199,20	4,02
	50 o/min, 50 g kuglica	44,34	5,94	2,55	27,50	199,20	4,02
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>41,85</b>		<b>2,00</b>		<b>191,50</b>	

### Analiza osetljivosti parametara

Analiza osetljivosti parametara (engl. *Automated Sensitivity Analysis*, ASA) sprovedena je kako bi se ispicao uticaj: (1) efektivne permeabilnosti, (2) odnosa koncentracija leka u krvi/plazmi, (3) slobodne frakcije leka u plazmi, (4) rastvorljivosti i (5) klirensa na procenat apsorbovanog ibuprofena,  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ . U skladu sa Simcyp® osnovnim podešavanjima vrednosti navedenih parametara varirane su u opsegu 1/10 do 10 puta veće vrednosti u odnosu na vrednost koja je inicijalno korišćena u simulaciji. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 51.



Slika 51. Analiza osetljivosti parametara (ASA). Zavisnost (a)  $F_a$ , (b)  $c_{max}$  i (c)  $PIK_{0-\infty}$  od različitih ulaznih parametara (sredina x-ose za svaki od parametara predstavlja vrednost koja je korišćena u razvoju modela)



Na osnovu rezultata ASA može se uočiti da na obim apsorpcije ibuprofena utiču permeabilnost i rastvorljivost i to samo kada su njihove vrednosti 1/3 ili niže u odnosu na inicijalno korišćene vrednosti, kada se očekuje smanjenje procenta apsorbovanog leka. Rezultati su takođe pokazali da vrednost  $C_{max}$  zavisi od svih ispitivanih parametara, a naročito veliki uticaj ima klirens leka. Najveće promene u vrednosti  $PIK_{0-\infty}$  takođe se mogu zapaziti pri variranju vrednosti klirensa leka.

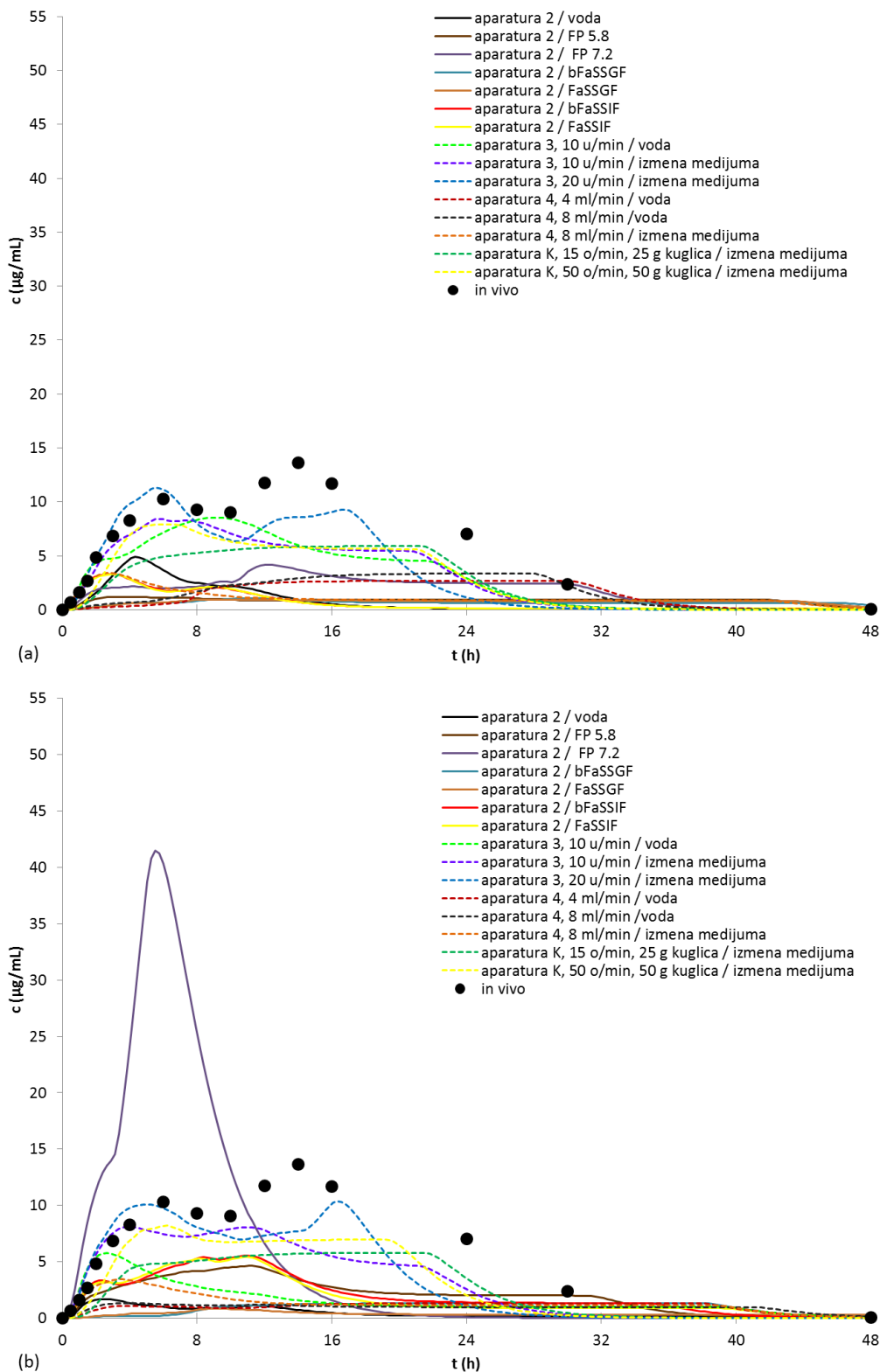
### Razvoj i validacija modela za preparate sa produženim oslobađanjem ibuprofena

U sledećoj fazi istraživanja model razvijen za tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena korišćen je za simulaciju apsorpcije ibuprofena iz preparata sa produženim oslobađanjem. Upotrebljeni su ulazni parametri navedeni u tabeli 31, s tim što je u skladu sa dizajnom *in vivo* studije (Pargal i sar, 1996) korišćena doza od 800 mg, a vreme simulacije produženo na 48 h. S obzirom da je u Simcyp<sup>®</sup>-u za simulaciju procesa apsorpcije iz preparata sa produženim oslobađanjem neophodno da se kao ulazni parametar unese *in vitro* profil brzine rastvaranja, u simulacijama su korišćeni eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja prikazani na slikama 47 i 48. Simulirani plazma profili ibuprofena prikazani su na slici 52. Može se zapaziti da su kod većine profila (osim plazma profila dobijenog na osnovu profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom i fosfatnom puferu pH 7,2 za preparat I3) vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$  značajno niže u poređenju sa vrednostima zabeleženim u studiji Pargal i sar. (1996). U prilog tome govore i visoke vrednosti greški predviđanja prikazanih u tabeli 34.

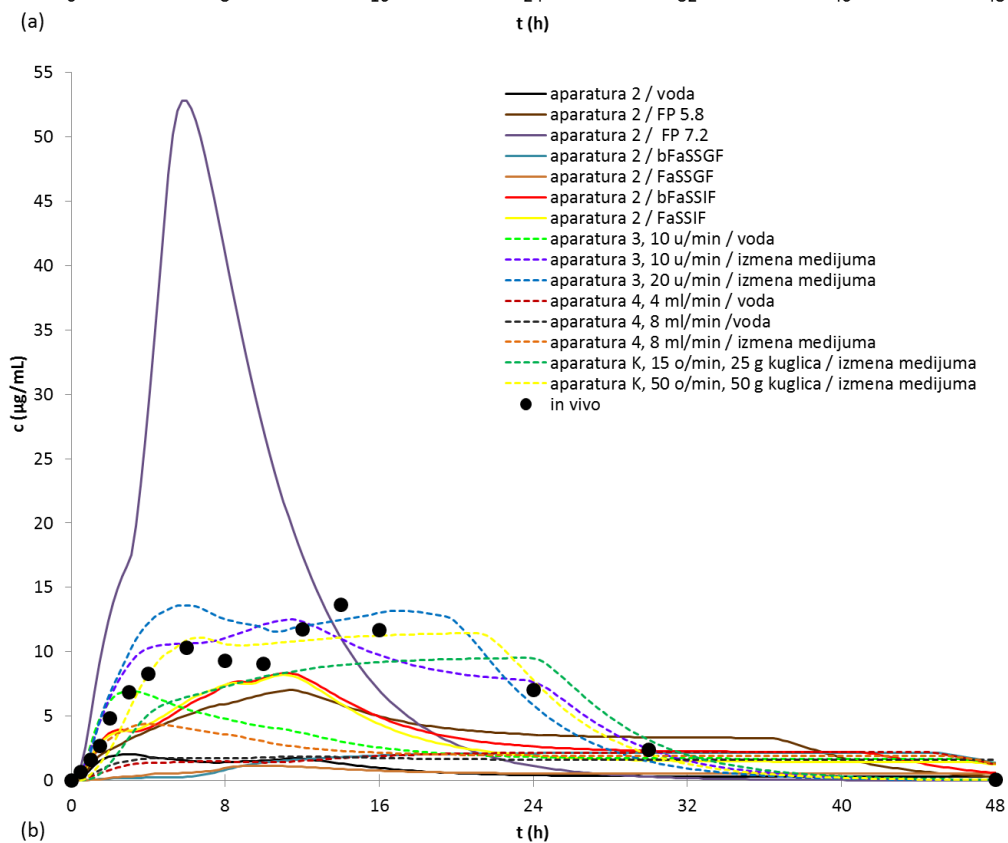
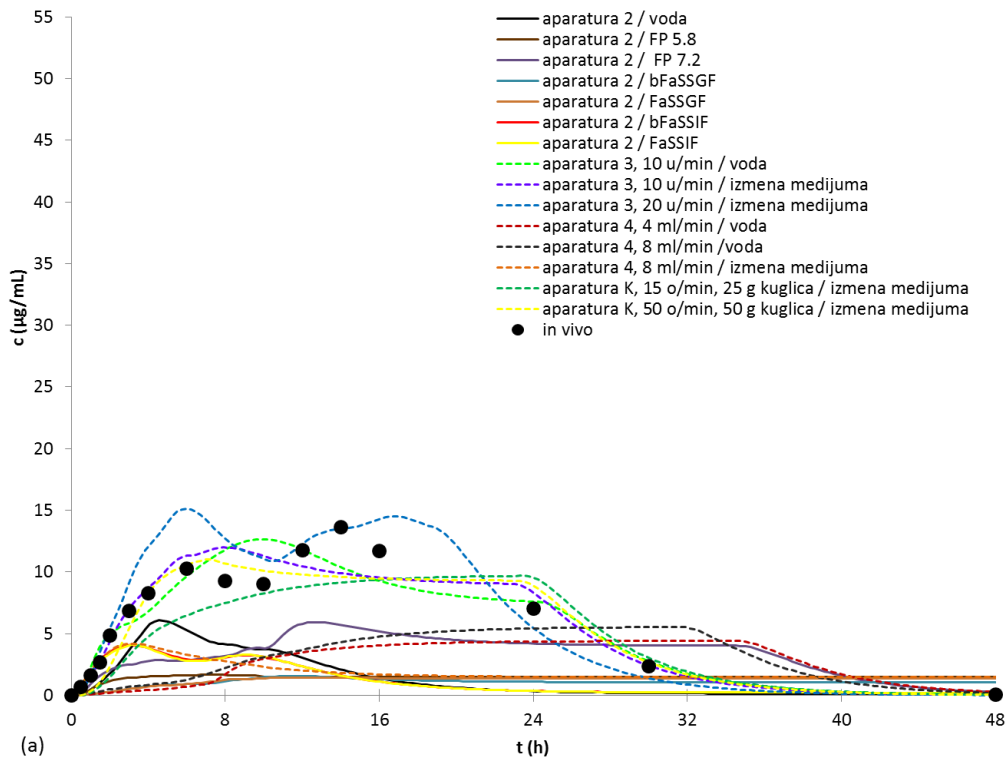
S obzirom da su rezultati ASA pokazali da variranje vrednosti klirensa leka pokazuje najveći uticaj na  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  ovaj parametar je optimizovan korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> *Parametar Estimation* opcije. Simcyp<sup>®</sup> *Parametar Estimation* opcija omogućava procenu vrednosti određenog parametra kako bi se dobilo što bolje slaganje predviđenih i *in vivo* rezultata. Prethodno je neophodno definisati težinsku funkciju kojom se procenjuje razlika između predviđanja modela i *in vivo* vrednosti, kao i metodu optimizacije. U ovom istraživanju korišćena je težinska funkcija *Weighted least square* i Nelder-Mead metoda optimizacije koje predstavljaju osnovne Simcyp<sup>®</sup> opcije. Nelder-Mead metoda predstavlja klasičnu optimizacionu metodu pogodnu za procenu velikog broja parametara. Vrednosti parametara procenjene ovom metodom jako zavise od ulaznih vrednosti parametara, kao i graničnih vrednosti te ih je pre izvođenja optimizacije neophodno pažljivo definisati (Simcyp<sup>®</sup> Simulator, 2014). Procenjena vrednost klirensa leka od 1,8 L/h nalazi se u opsegu literaturnih vrednosti (Davies, 1998; Geisslinger i sar, 1989) te je prihvaćena za razvoj modela. Takođe je zapaženo da predviđeni obim apsorpcije pokazuje značajno niže vrednosti u poređenju sa *in vivo* rezultatima. Uzimajući u obzir da se najveći procenat ibuprofena iz preparata sa produženim oslobađanjem apsorbuje u kolonu (Parr i sar, 1987), vreme zadržavanja u kolonu prepoznato je kao parametar koji značajno utiče na obim apsorpcije ibuprofena. Iz tog razloga i vreme zadržavanja u kolonu je procenjeno korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> *Parametar Estimation* opcije i dobijena vrednost od 15,8 h koja je u saglasnosti sa rezultatima Ghoshal i sar. (2012) i prihvaćena je za razvoj modela.

Plazma profili ibuprofena predviđeni korišćenjem TO modela sa modifikovanim vrednostima klirensa leka i vremena zadržavanja u kolonu (modifikovani TO model) prikazani su na slici 53. Na osnovu prikazanih profila može se uočiti da se preciznija predviđanja dobijaju korišćenjem *in vitro* profila brzine rastvaranja u kojima je više od 40% lekovite supstance rastvoreno nakon 12 h, odnosno 80% nakon 24 h. Vrednosti relevantnih farmakokinetičkih parametara, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 34. Na osnovu prikazanih rezultata može se zapaziti da je najveća sličnost simuliranog i stvarnog profila koncentracije ibuprofena u plazmi, za oba preparata sa produženim oslobađanjem ibuprofena, dobijena kada je kao ulazni profil korišćen eksperimentalno dobijen profil brzine rastvaranja

ibuprofena u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem pri 20 uranjanja u minuti uz izmenu medijuma kao i profil brzine rastvaranja u aparaturi sa staklenim kuglicama pri korišćenju eksperimentalne postavke 50 obrtaja u minuti i 50 g kuglica uz izmenu medijuma.

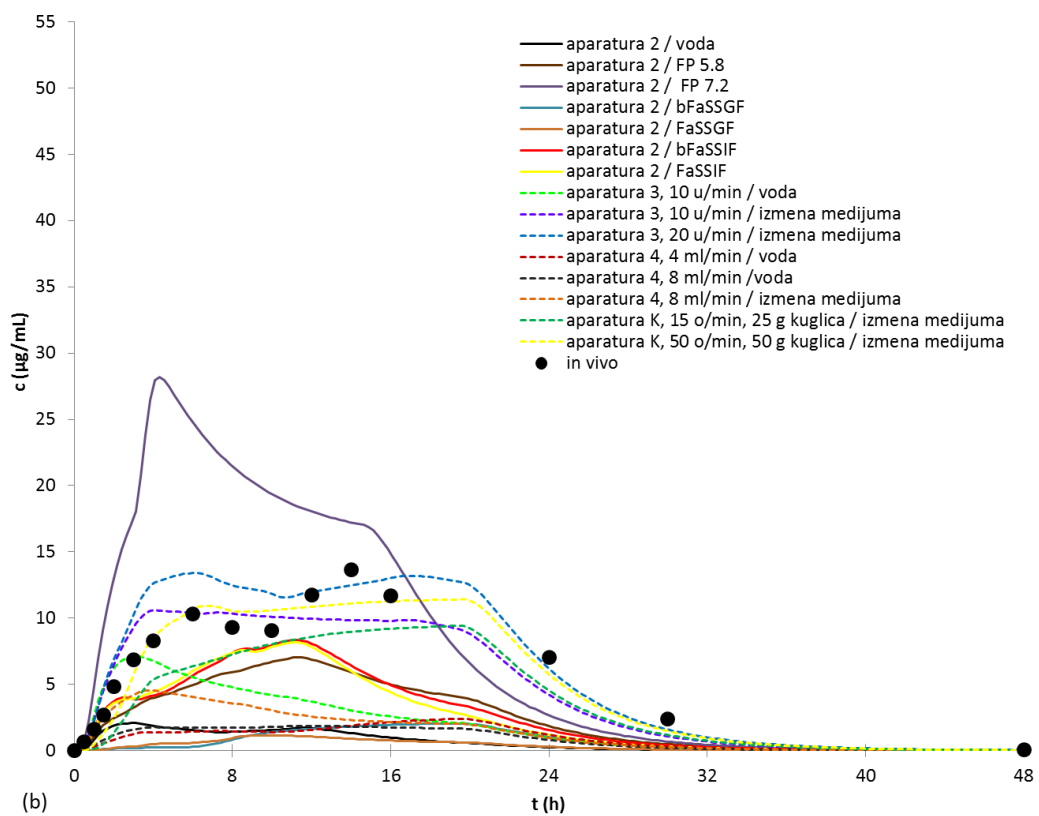
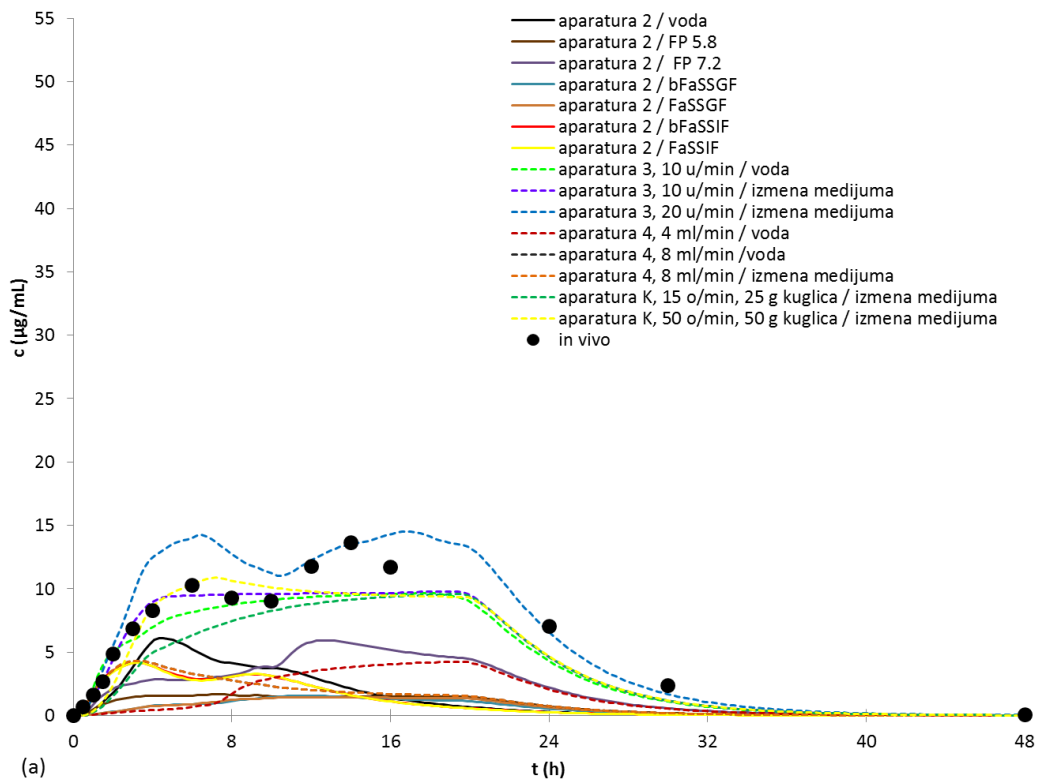


Slika 52. Simulirani profili koncentracije ibuprofena u plazmi dobijeni primenom TO modela gastrointestinalne simulacije za: (a) preparat I2 i (b) preparat I3



Slika 53. Simulirani profili koncentracije ibuprofena u plazmi dobijeni primenom modifikovanog TO modela gastrointestinalne simulacije za: (a) preparat I2 i (b) preparat I3

Da bi se ispitala mogućnost primene *Simcyp*<sup>®</sup> *Controlled/Modified (CR/MR) Release* opcije, koja je namenjena GI simulaciji apsorpcije iz preparata sa produženim oslobađanjem, eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja ibuprofena korišćeni su kao ulazni parametar u okviru ove opcije (PO model). Dobijeni rezultati prikazani su na slici 54 i tabeli 34.



Slika 54. Simulirani profili koncentracije ibuprofena u plazmi dobijeni primenom PO modela gastrointestinalne simulacije za: (a) preparat I2 i (b) preparat I3

Tabela 34. Farmakokinetički parametri predviđeni razvijenim modelima gastrointestinalne simulacije i odgovarajuće greške predviđanja

<i>TO model gastrointestinalne simulacije</i>											
<i>In vitro</i> profil		preparat I2					preparat I3				
Uređaj	Medijum/ Hidrodinamika	C <sub>max1</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max1</sub> (h) (%PE)	C <sub>max2</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max2</sub> (h) (%PE)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml) (%PE)	C <sub>max1</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max1</sub> (h) (%PE)	C <sub>max2</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max2</sub> (h) (%PE)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml) (%PE)
Aparatura 2	Voda	4,89 (52,52)	4,32 (28,00)	-	-	39,3 (83,76)	1,68 (83,68)	2,4 (60,00)	1,01 (92,60)	10,56 (24,57)	22,21 (90,82)
	FP 5,8	1,17 (88,64)	3,84 (36,00)	-	-	41,83 (82,72)	-	-	4,64 (66,00)	11,04 (21,14)	93,71 (61,29)
	FP 7,2	3,30 (67,96)	2,88 (52,00)	-	-	32,65 (86,51)	41,5 (302,91)	5,52 (8,00)	-	-	255,01 (5,33)
	bFaSSGF	-	-	1,08 (92,08)	11,4 (18,57)	31,91 (86,81)	-	-	1,30 (90,47)	37,68 (169,14)	43,94 (81,85)
	FaSSGF	-	-	0,95 (93,04)	10,8 (22,85)	36,02 (85,12)	0,83 (91,94)	9,12 (52,00)	-	-	17,76 (92,66)
	bFaSSIF	-	-	4,16 (69,52)	12,24 (12,57)	85,61 (64,63)	-	-	5,54 (59,41)	11,04 (21,14)	95,13 (60,70)
	FaSSIF	3,31 (67,86)	3,12 (48,00)	2,03 (85,12)	8,16 (41,71)	32,37 (86,63)	-	-	5,39 (60,51)	11,04 (21,14)	87,87 (63,70)
Aparatura 3	Voda/10 u/min	8,56 (16,89)	9,12 (52,00)	-	-	144,07 (40,49)	5,76 (44,07)	2,64 (56,00)	-	-	74,78 (69,11)
	Izmena medijuma/ 10 u/min	8,42 (18,25)	5,76 (4,00)	5,46 (60,00)	19,92 (42,28)	146,18 (39,61)	8,09 (21,45)	3,84 (36,00)	7,93 (41,90)	10,08 (28,00)	150,65 (37,77)
	Izmena medijuma/ 20 u/min	11,33 (10,00)	5,52 (8,00)	9,20 (32,60)	16,32 (16,57)	165,21 (31,75)	9,68 (6,01)	3,84 (36,00)	10,39 (23,88)	16,32 (16,57)	165,38 (31,68)
Aparatura 4	Voda/4 ml/min	-	-	2,68 (80,36)	30,00 (114,28)	70,03 (71,07)	-	-	1,33 (90,25)	37,44 (167,42)	48,28 (80,05)
	Voda/8 ml/min	-	-	3,36 (75,38)	27,84 (98,85)	78,60 (67,53)	1,34 (86,99)	4,08 (32,00)	-	-	45,06 (81,38)
	Izmena medijuma/ 8 ml/min	3,41 (66,89)	2,64 (56,00)	-	-	53,62 (77,85)	3,46 (66,40)	3,60 (40,00)	-	-	62,62 (74,13)
Aparatura K	Izmena medijuma/ 15 o/min, 25 g kuglica	-	-	5,91 (56,70)	21,12 (50,85)	125,34 (48,22)	4,38 (57,47)	4,08 (32,00)	5,81 (57,43)	21,36 (52,57)	124,36 (48,63)
	Izmena medijuma/ 50 o/min, 50 g kuglica	7,91 (23,20)	6,24 (4,00)	-	-	139,79 (42,25)	8,20 (20,38)	6,24 (4,00)	6,97 (48,93)	18,48 (32,00)	146,17 (39,62)

*modifikovani TO model gastrointestinalne simulacije*

<i>In vitro</i> profil		preparat I2					preparat I3				
Uređaj	Medijum/ Hidrodinamika	$C_{max1}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) (%PE)	$t_{max1}$ (h) (%PE)	$C_{max2}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) (%PE)	$t_{max2}$ (h) (%PE)	$PIK_{0-t}$ ( $\mu\text{gh/ml}$ ) (%PE)	$C_{max1}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) (%PE)	$t_{max1}$ (h) (%PE)	$C_{max2}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) (%PE)	$t_{max2}$ (h) (%PE)	$PIK_{0-t}$ ( $\mu\text{gh/ml}$ ) (%PE)
Aparatura 2	Voda	6,08 (40,97)	4,46 (25,67)	-	-	62,31 (74,26)	2,03 (80,29)	2,88 (52,00)	1,59 (88,35)	10,56 (24,57)	35,84 (85,19)
	FP 5,8	1,69 (83,59)	7,44 (24,00)	-	-	70,62 (70,83)	7,02 (31,84)	11,28 (88,00)	3,30 (75,82)	35,04 (150,28)	168,89 (30,23)
	FP 7,2	-	-	5,93 (56,55)	12,72 (9,14)	158,92 (34,35)	52,78 (412,42)	6,00 (0,00)	-	-	420,35 (73,62)
	bFaSSGF	-	-	1,58 (88,42)	11,52 (17,71)	51,11 (78,88)	-	-	2,14 (84,32)	44,64 (218,85)	81,13 (66,48)
	FaSSGF	-	-	1,44 (89,45)	12,00 (14,28)	59,45 (75,44)	1,14 (88,93)	9,6 (60,00)	-	-	28,42 (88,26)
	bFaSSIF	4,08 (60,38)	3,12 (48,00)	3,13 (77,06)	8,16 (41,71)	52,90 (78,14)	-	-	8,36 (38,75)	11,28 (19,42)	167,56 (30,78)
	FaSSIF	4,08 (60,38)	3,12 (48,00)	3,20 (76,55)	8,40 (40,00)	52,42 (78,34)	-	-	8,20 (39,92)	11,04 (21,14)	149,12 (38,40)
Aparatura 3	Voda/10 u/min/	12,65 (22,81)	10,08 (68,00)	7,66 (43,88)	23,28 (66,28)	254,88 (5,27)	6,98 (32,23)	3,12 (48,00)	-	-	128,24 (47,03)
	Izmena medijuma/ 10 u/min	11,99 (16,40)	7,92 (32,00)	9,07 (33,55)	22,08 (57,71)	259,27 (7,09)	-	-	12,49 (8,49)	11,28 (19,42)	264,91 (9,42)
	Izmena medijuma/ 20 u/min	15,11 (46,69)	6,00 (0,00)	14,21 (4,10)	15,84 (13,14)	291,59 (20,44)	13,61 (32,13)	6,00 (0,00)	13,15 (3,66)	16,56 (18,28)	288,68 (19,23)
Aparatura 4	Voda/ 4 ml/min	-	-	4,41 (67,69)	34,56 (146,85)	134,16 (44,58)	-	-	2,19 (83,95)	43,92 (213,71)	88,60 (63,40)
	Voda/8 ml/min	-	-	5,53 (59,48)	31,68 (126,28)	150,21 (37,95)	-	-	1,86 (86,37)	12,00 (14,28)	77,07 (68,16)
	Izmena medijuma/ 8 ml/min	4,2 (59,22)	3,12 (48,00)	-	-	89,94 (62,85)	4,40 (57,28)	3,84 (36,00)	-	-	109,88 (54,61)
Aparatura K	Izmena medijuma/15 o/min, 25 g kuglica	-	-	9,69 (29,01)	23,52 (68,00)	228,34 (5,68)	-	-	9,52 (30,25)	23,76 (69,71)	226,68 (6,36)
	Izmena medijuma/50 o/min, 50 g kuglica	11,02 (6,99)	7,2 (20,00)	9,31 (31,79)	22,32 (59,42)	250,98 (3,66)	10,88 (5,63)	6,00 (0,00)	11,45 (16,11)	21,22 (51,57)	262,26 (8,32)

*PO model gastrointestinalne simulacije*

<i>In vitro</i> profil		preparat I2					preparat I3				
Uređaj	Medijum/ Hidrodinamika	C <sub>max1</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max1</sub> (h) (%PE)	C <sub>max2</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max2</sub> (h) (%PE)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml) (%PE)	C <sub>max1</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max1</sub> (h) (%PE)	C <sub>max2</sub> (µg /ml) (%PE)	t <sub>max2</sub> (h) (%PE)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml) (%PE)
Aparatura 2	Voda	6,13 (40,48)	4,56 (24,00)	-	-	60,14 (75,15)	2,07 (79,90)	3,12 (48,00)	1,59 (88,35)	10,56 (24,57)	29,07 (87,99)
	FP 5,8	1,67 (83,78)	7,2 (20,00)	-	-	35,84 (85,19)	-	-	7,03 (48,49)	11,28 (19,42)	115,74 (52,19)
	FP 7,2	-	-	5,93 (56,55)	12,72 (9,14)	100,17 (58,62)	28,19 (173,68)	4,32 (28,00)	-	-	364,89 (50,71)
	bFaSSGF	-	-	1,58 (88,42)	11,52 (17,71)	26,96 (88,86)	-	-	2,05 (84,98)	19,68 (40,57)	32,91 (86,40)
	FaSSGF	-	-	1,44 (89,45)	12,00 (14,28)	28,53 (88,21)	1,14 (88,93)	9,60 (60,00)	-	-	16,82 (93,05)
	bFaSSIF	4,17 (59,51)	3,12 (48,00)	3,12 (77,14)	8,16 (41,71)	48,16 (80,10)	-	-	8,37 (38,68)	11,28 (19,42)	123,67 (48,91)
	FaSSIF	4,18 (59,41)	3,12 (48,00)	3,13 (77,06)	8,16 (41,71)	47,66 (80,31)	-	-	8,18 (40,07)	11,04 (21,14)	116,18 (52,01)
Aparatura 3	Voda/10 u/min	-	-	9,66 (29,23)	18,00 (28,57)	206,34 (14,77)	-	-	7,12 (47,83)	3,12 (77,71)	89,94 (62,85)
	Izmena medijuma/ 10 u/min	9,05 (12,13)	4,32 (28,00)	9,78 (28,35)	18,72 (33,71)	219,63 (9,28)	10,58 (2,71)	4,08 (32,00)	9,81 (28,13)	16,56 (18,28)	227,40 (6,07)
	Izmena medijuma/20 u/min	13,81 (34,07)	5,52 (8,00)	-	-	302,26 (24,84)	13,39 (30,00)	6,00 (0,00)	13,11 (3,95)	16,32 (16,57)	292,11 (20,65)
Aparatura 4	Voda/4 ml/min	-	-	4,25 (68,86)	19,44 (38,85)	68,69 (71,62)	-	-	2,40 (82,41)	19,68 (40,57)	43,42 (82,06)
	Voda/8 ml/min	-	-	5,19 (61,97)	10,68 (23,71)	83,09 (65,67)	1,86 (81,94)	12,00 (100,00)	-	-	40,37 (83,32)
	Izmena medijuma/8 ml/min	4,31 (58,15)	3,36 (44,00)	-	-	56,18 (76,79)	4,55 (55,82)	3,84 (36,00)	-	-	67,09 (72,28)
Aparatura K	Izmena medijuma/ 15 o/min, 25 g kuglica	-	-	9,58 (29,81)	19,44 (38,85)	188,48 (22,14)	-	-	9,41 (31,06)	19,44 (38,85)	185,52 (23,37)
	Izmena medijuma/50 o/min, 50 g kuglica	10,90 (5,82)	7,20 (20,00)	9,37 (31,35)	18,72 (33,71)	218,58 (9,71)	10,41 (1,06)	5,76 (4,00)	11,41 (16,41)	19,68 (40,57)	245,75 (1,50)
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>10,30</b>	<b>6,00</b>	<b>13,65</b>	<b>14,00</b>	<b>242,10</b>					

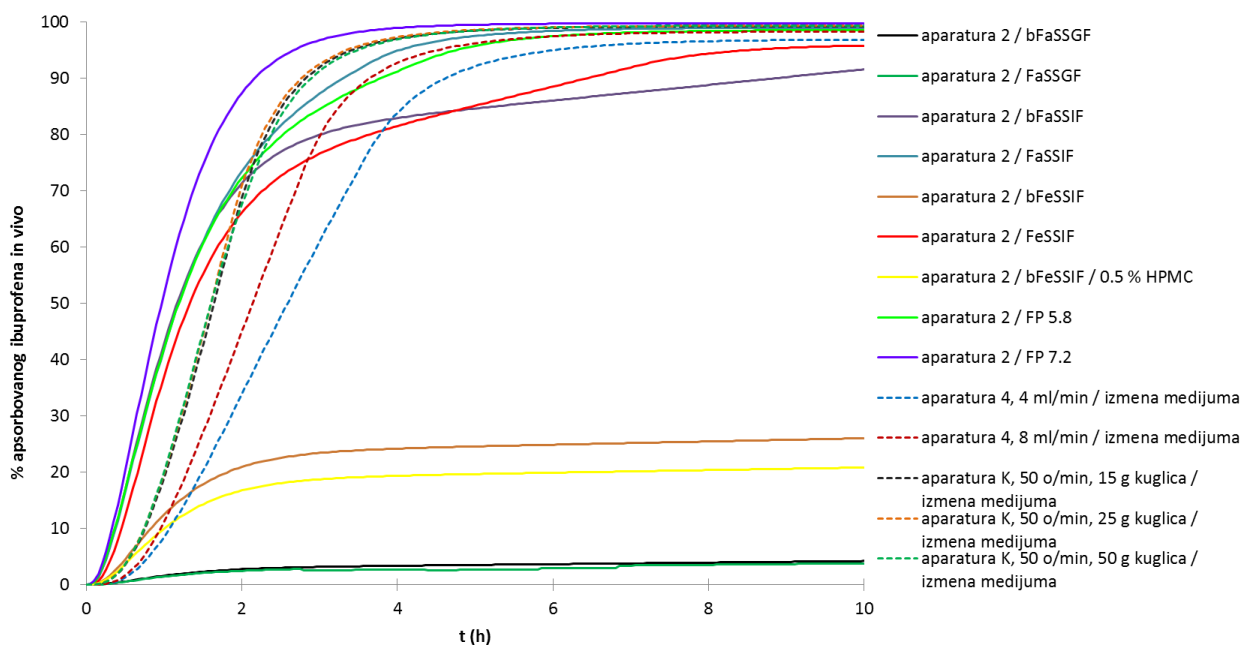
Može se zapaziti da su vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$  dobijeni korišćenjem *Simcyp*<sup>®</sup> *CR/MR* opcije nešto niže u poređenju sa vrednostima dobijenim korišćenjem modifikovanog TO modela. Razlog tome je što se u okviru *Simcyp*<sup>®</sup>-a profil unet u okviru *CR/MR* opcije posmatra kao procenat leka oslobođenog iz formulacije, ali ne i rastvorenog (*Simcyp*<sup>®</sup> Simulator, 2014), a ova dva profila se kod teško rastvorljivih lekovitih supstanci kao što je ibuprofen mogu značajno razlikovati. Ovakvi rezultati dovode do zaključka da je korišćenje opcije za trenutno oslobađanje u slučaju ibuprofena, kao i ostalih teško rastvorljivih lekovitih supstanci najprihvatljivije. Iz tog razloga će u daljim istraživanjima za simulaciju apsorpcije ibuprofena iz preparata sa produženim oslobađanjem biti korišćen modifikovani TO model.

### Identifikacija profila apsorpcije ibuprofena primenom *Simcyp*<sup>®</sup> gastrointestinalne simulacije

Cilj ovih ispitivanja bio je da se proceni mogućnost primene razvijenih *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila i uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom korišćenjem GastroPlus<sup>™</sup> programskog paketa.

#### Tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena

*In silico* profili apsorpcije ibuprofena nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 55. Značajne razlike u simuliranim profilima apsorpcije ukazuju na dominantan uticaj brzine rastvaranja na apsorpciju ibuprofena u odnosu na ostale ulazne parametre korišćene u simulaciji. Može se uočiti da u slučajevima kada brzina rastvaranja nije ograničavajući faktor (više od 80% ibuprofena rastvoreno nakon 20 min), apsorpcija ibuprofena se odvija relativno brzo i potpuna je nakon 3 h. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa literaturnim podacima o potpunoj apsorpciji ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem koja se dominantno odvija u jejunumu (Gura i sar, 2012).

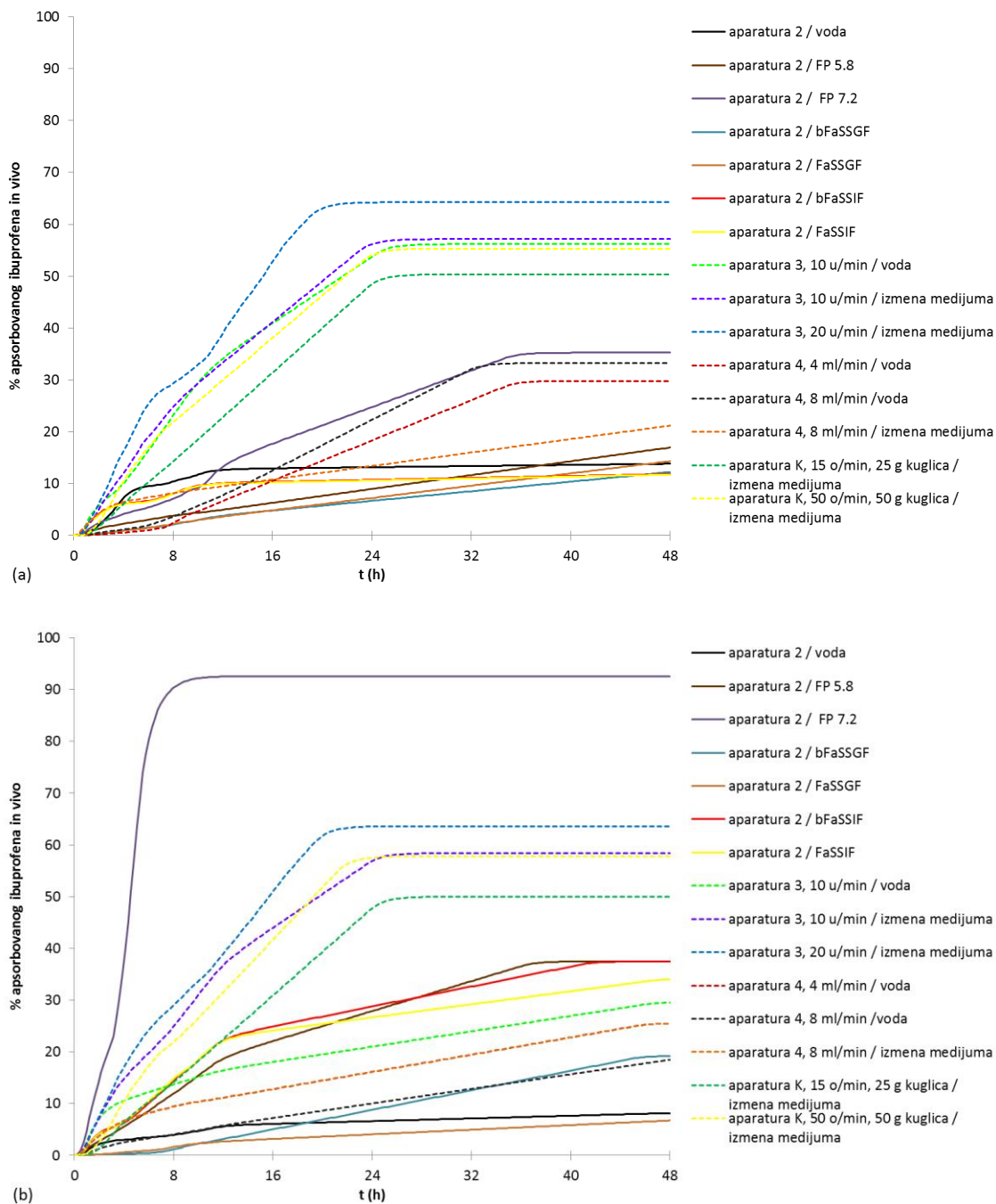


Slika 55. Simulirani *in vivo* profili apsorpcije ibuprofena na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (preparat II)



## Tablete sa produženim oslobađanjem ibuprofena

*In silico* profili apsorpcije ibuprofena dobijeni primenom modifikovanog TO modela gastrointestinalne simulacije na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ibuprofena prikazani su na slici 56a za tablete sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa (preparat I2), odnosno 56b za tablete sa produženim oslobađanjem tipa lipofilnog matriksa (preparat I3). Simulirani profili apsorpcije ibuprofena pokazuju razlike koje su u skladu sa razlikama između odgovarajućih *in vitro* profila dobijenih pri različitim eksperimentalnim uslovima (slike 47 i 48).



Slika 56. Simulirani profili apsorpcije ibuprofena dobijeni primenom modifikovanog TO modela na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja iz tableta sa produženim oslobađanjem: (a) tipa hidrofilnog matriksa (preparat I2) i (b) tipa lipofilnog matriksa (preparat I3)

#### 4.4.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja vrednosti ulaznih parametara prikazane u tabeli 31, primenjene su u okviru komercijalno dostupnog GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) programskog paketa. Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija. GastroPlus™ programski paket zasnovan je na Unapređenom modelu apsorpcije i tranzita (*Advanced Compartmental Absorption Transit model*, ACAT) koji podrazumeva sličnu strukturu GI trakta kao i ADAM model. U okviru oba modela GI trakt je podeljen na devet segmenata a svaki od segmenata okarakterisan je specifičnim vrednostima parametara koji su od značaja za proces apsorpcije, kao što su: zapremina intestinalnog sadržaja, pH vrednost, površina dostupna za apsorpciju i dr. (tabela 35). Važna karakteristika ACAT modela (i razlika u odnosu na ADAM model) je sposobnost izračunavanja konstante brzine apsorpcije leka ( $K_a$ ) u skladu sa regionalnom promenom permeabilnosti leka kroz membranu. Izračunavanje njene vrednosti vrši se pomoću modula Opt log D Model SA/V 6.1 množenjem efektivne permeabilnosti i ASF faktora specifičnog za svaki segment u okviru modela. Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode Rodgers i Rowland kao i u slučaju Simcyp®-a, i dobijena je vrednost od 0,12 L/kg (u slučaju Simcyp®-a predviđen je volumen distribucije od 0,1 L/kg).

Tabela 35. Uporedni pregled vrednosti parametara za svaki od segmenata GI trakta u okviru ADAM, odnosno ACAT modela apsorpcije

Segment GI trakta*	ASF		Zapremina (ml)		Vreme zadržavanja (min)		pH		Koncentracija žučnih soli (mM)	
	ADAM	ACAT	ADAM	ACAT	ADAM	ACAT	ADAM	ACAT	ADAM	ACAT
	1	-	0	53	50	24	15	1,5	1,3	0,29
2	-	2,845	35	48	9,2	16	6,4	6,0	3,3	2,80
3	-	2,780	24	175	35	57	6,5	6,2	2,3	2,33
4	-	2,739	24	140	35	46	6,6	6,4	3,6	2,03
5	-	2,689	14	109	30	35	6,8	6,6	1,3	1,41
6	-	2,610	14	79	30	26	7,0	6,9	1,3	1,16
7	-	2,510	14	56	30	19	7,1	7,4	1,3	0,14
8	-	1,705	14	53	30	270	7,3	6,4	1,3	0
9	-	2,220	13	57	720	810	6,5	6,8	0,6	0

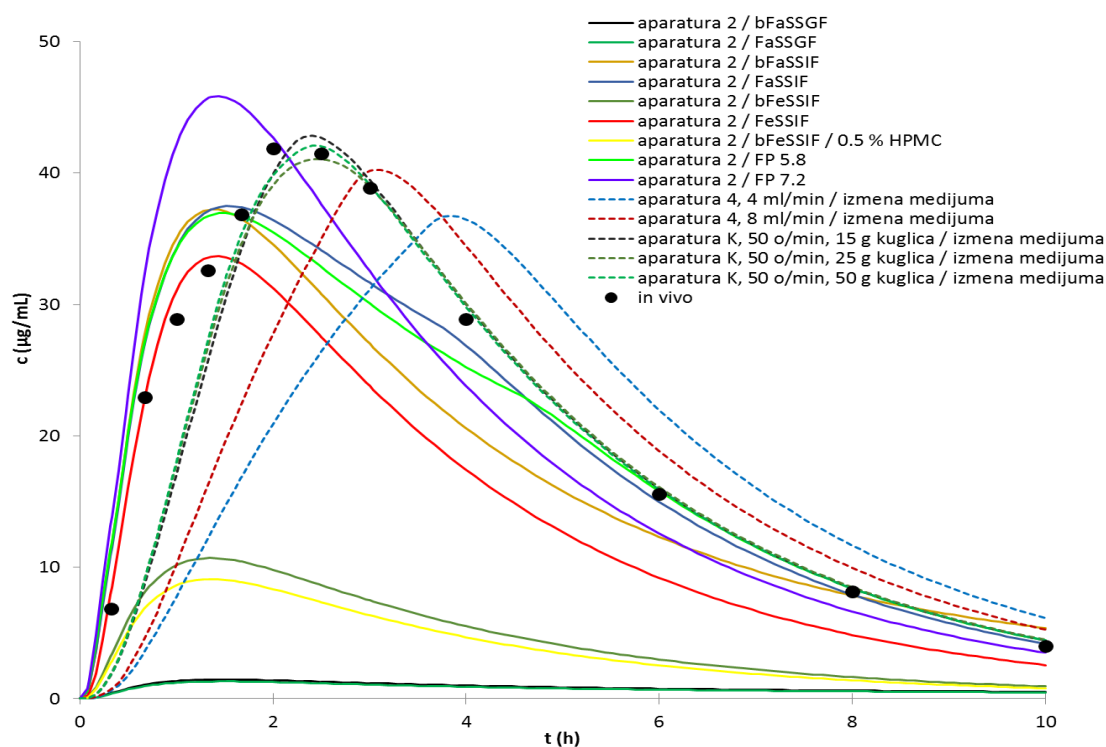
\*Segmenti GI trakta numerisani su brojevima od 1 do 9. Brojem 1 označen je želudac kod oba modela, dok je debelo crevo označeno brojem 9 u ADAM modelu a brojevima 8 i 9 u ACAT modelu (Opt log D Model SA/V 6.1)

#### Tablete sa trenutnim oslobađanjem

Simulirani profili koncentracije ibuprofena u plazmi dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta sa trenutnim oslobađanjem pod različitim eksperimentalnim uslovima prikazani su na slici 57. Može se uočiti da dobijeni profili odgovaraju profilima dobijenim u Simcyp®-u. I u ovom slučaju potvrđen je značajan uticaj *in vitro* profila brzine rastvaranja primenjenih kao ulaznih parametara za simulaciju apsorpcije. Analizom profila može se doći do sličnog zaključka, da se pouzdanija predviđanja dobijaju korišćenjem *in vitro* profila kod kojih je rastvoreno više od 80% ibuprofena nakon 20 minuta.

Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), dobijenih GastroPlus™ simulacijom na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem, kao i odgovarajuće vrednosti greške predviđanja prikazane su u tabeli 36. Na osnovu prikazanih rezultata najveća sličnost između simuliranog i stvarnog profila koncentracije ibuprofena u plazmi može se uočiti u slučaju kada je kao ulazni profil

korišćen eksperimentalno određen profil brzine rastvaranja u fosfatnom puferu pH 7,2 u aparaturi sa lopaticom, kao i profili dobijeni korišćenjem izmene medijuma u aparaturi sa staklenim kuglicama.



Slika 57. Profili koncentracije ibuprofena u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (preparat II) zajedno sa *in vivo* uočenim profilom

Tabela 36. Farmakokinetički parametri predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa trenutnim oslobađanjem i odgovarajuće greške predviđanja

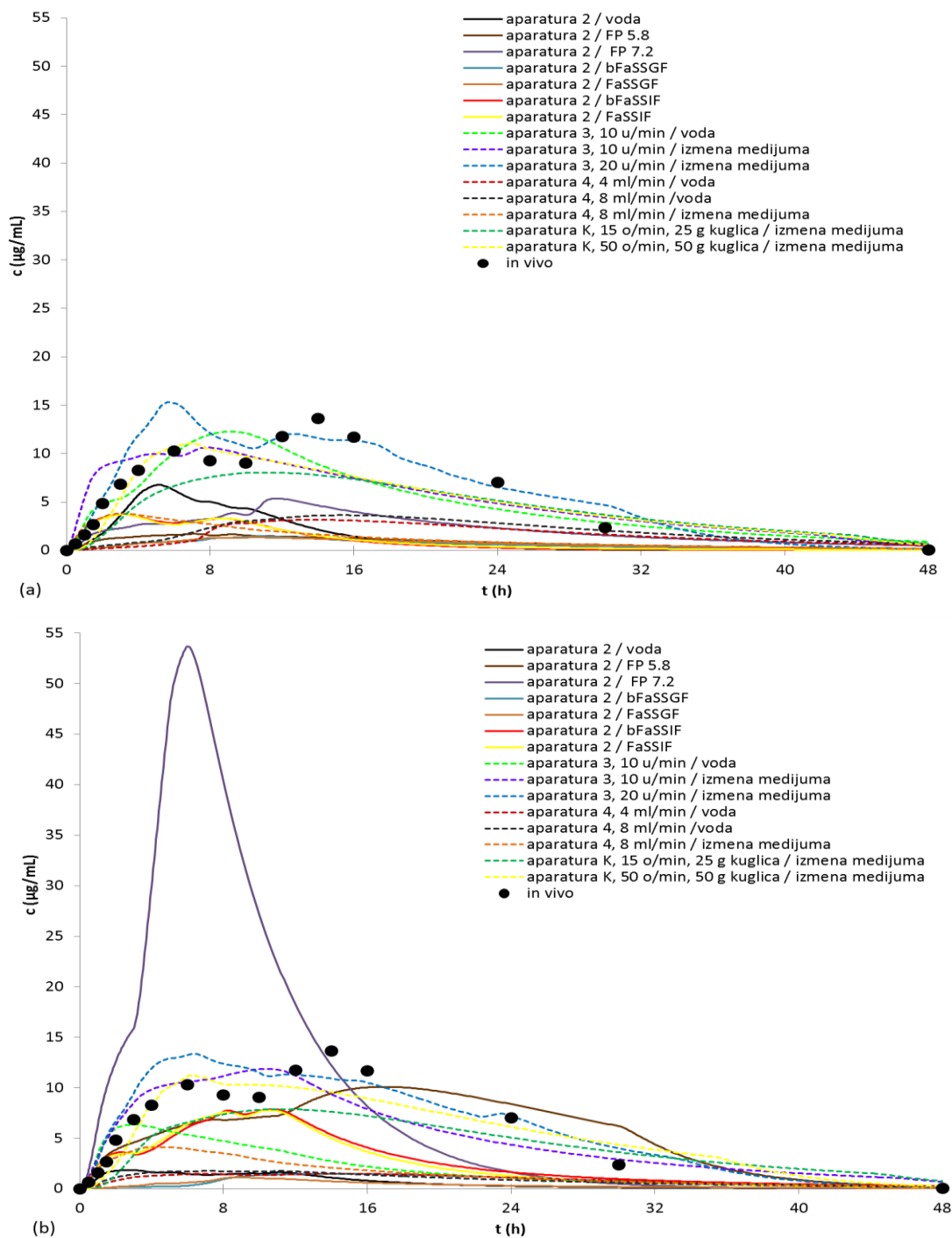
<b><i>In vitro</i> profil</b>		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	PIK <sub>0-t</sub>	%PE
Uređaj	Medijum/Hidrodinamika	(µg/ml)		(h)		(µgh/ml)	
Aparatura 2	bFaSSGF	1,45	96,53	1,52	24,00	15,80	91,74
	FaSSGF	1,35	96,77	1,45	27,50	12,35	93,55
	bFaSSIF	37,23	11,03	1,36	32,00	200,62	4,76
	FaSSIF	37,48	10,44	1,52	24,00	206,67	7,92
	bFeSSIF	10,70	74,43	1,36	32,00	50,74	73,50
	FeSSIF	33,67	19,54	1,44	28,00	150,65	21,33
	bFeSSIF/0,5% HPMC	8,23	80,33	1,36	32,00	45,26	76,36
	FP 5,8	36,95	11,70	1,52	24,00	206,48	7,82
	FP 7,2	45,87	9,60	1,44	28,00	206,88	8,03
Aparatura 4	4 ml/min	36,76	12,16	3,84	92,00	206,14	7,64
	8 ml/min	40,23	3,87	3,12	56,00	206,58	7,87
Aparatura K	50 o/min, 15 g kuglica	42,82	2,31	2,40	20,00	206,79	7,98
	50 o/min, 25 g kuglica	41,05	1,91	2,48	24,00	206,77	7,97
	50 o/min, 50 g kuglica	42,09	0,57	2,40	20,00	206,79	7,98
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>41,85</b>		<b>2,00</b>		<b>191,50</b>	

Generalno se može uočiti da su vrednosti  $C_{max}$  dobijene GastroPlus™ simulacijama nešto niže u poređenju sa vrednostima dobijenim simulacijama u Simcyp®-u što se može objasniti višom vrednošću volumena distribucije koja je predviđena u GastroPlus™-u. Ako posmatramo

vrednosti  $t_{max}$ , nešto brža apsorpcija zabeležena je u GastroPlus™-u dok su i vrednosti  $PIK_{0-t}$  više, što se može pripisati razlikama u vremenima zadržavanja u pojedinim delovima GI trakta.

### Tablete sa produženim oslobađanjem

Simulirani profili koncentracije ibuprofena u plazmi dobijeni korišćenjem modifikovanog TO modela u GastroPlus®-u na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta sa produženim oslobađanjem (a) tipa hidrofilnog matriksa (preparat I2) i (b) tipa lipofilnog matriksa (preparat I3) prikazani su na slici 58.



Slika 58. Simulirani profili koncentracije ibuprofena u plazmi dobijeni primenom modifikovanog TO modela gastrointestinalne simulacije u GastroPlus™ programskom paketu za: (a) preparat I2 i (b) preparat I3

Tabela 37. Farmakokinetički parametri predviđeni modifikovanim TO modelom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije i odgovarajuće greške predviđanja

<b><i>In vitro</i> profil</b>		<b>preparat I2</b>					<b>preparat I3</b>				
Uređaj	Medijum/ Hidrodinamika	C <sub>max1</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max1</sub> (h) (%PE)	C <sub>max2</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max2</sub> (h) (%PE)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml) (%PE)	C <sub>max1</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max1</sub> (h) (%PE)	C <sub>max2</sub> (µg/ml) (%PE)	t <sub>max2</sub> (h) (%PE)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml) (%PE)
Aparatura 2	Voda	6,78 (34,17)	5,12 (14,67)	-	-	65,52 (72,93)	1,84 (82,13)	2,88 (52,00)	1,74 (87,25)	11,22 (19,85)	29,27 (87,91)
	FP 5,8	1,72 (83,30)	7,10 (18,33)	-	-	43,30 (82,11)	6,98 (32,23)	7,43 (23,83)	10,09 (26,08)	16,96 (21,14)	256,59 (5,98)
	FP 7,2	3,99 (61,26)	9,32 (55,33)	5,38 (60,58)	11,72 (16,28)	114,50 (52,70)	53,68 (421,16)	6,00 (0,00)	-	-	437,37 (80,65)
	bFaSSGF	-	-	1,46 (89,30)	11,00 (21,42)	31,25 (87,09)	-	-	1,49 (89,08)	14,24 (1,71)	42,56 (82,42)
	FaSSGF	-	-	1,34 (90,18)	10,56 (24,57)	34,47 (85,76)	1,12 (89,12)	8,9 (48,33)	-	-	18,79 (92,23)
	bFaSSIF	3,73 (63,78)	3,1 (48,33)	3,35 (75,45)	8,94 (36,14)	47,83 (80,24)	3,67 (64,36)	2,27 (62,16)	7,85 (42,49)	10,88 (22,28)	129,54 (46,49)
	FaSSIF	3,76 (63,49)	3,2 (46,67)	3,3 (75,82)	8,87 (36,64)	50,1 (79,30)	7,76 (24,66)	7,96 (32,66)	7,77 (43,07)	10,56 (24,57)	119,1 (50,80)
Aparatura 3	Voda/ 10 u/min	12,28 (19,22)	9,12 (52,00)	-	-	242,42 (0,13)	6,35 (38,34)	3,04 (49,33)	-	-	96,14 (60,28)
	Izmena medijuma/ 10 u/min	10,11 (1,84)	4,62 (23,00)	10,62 (22,19)	7,84 (44,00)	251,57 (3,91)	-	-	11,87 (13,04)	10,34 (26,14)	252,5 (4,29)
	Izmena medijuma/ 20 u/min	15,3 (48,54)	5,7 (5,00)	12,16 (10,91)	12,86 (8,14)	298,73 (23,39)	13,37 (29,80)	6,34 (5,67)	11,39 (16,55)	11,98 (14,42)	293,96 (21,42)
Aparatura 4	Voda/4 ml/min	-	-	3,16 (76,84)	13,8 (1,42)	88,46 (63,46)	-	-	1,5 (89,01)	14,56 (4,00)	49,92 (79,38)
	Voda/8 ml/min	-	-	3,64 (73,33)	15,36 (9,71)	108,58 (55,15)	-	-	1,76 (87,10)	11,10 (20,71)	47,25 (80,48)
	Izmena medijuma/ 8 ml/min	3,81 (63,00)	3,25 (45,83)	-	-	62,33 (74,25)	4,13 (59,90)	4,1 (31,66)	-	-	75,31 (68,89)
Aparatura K	Izmena medijuma/ 15 o/min, 25 g kuglica	8,05 (21,84)	11,14 (85,67)	-	-	215,38 (11,03)	7,88 (23,49)	11,24 (87,33)	-	-	212,67 (12,15)
	Izmena medijuma/ 50 o/min, 50 g kuglica	11,09 (7,66)	7,04 (17,33)	-	-	241,12 (0,40)	11,23 (9,02)	6,28 (4,66)	-	-	261,34 (7,94)
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>10,30</b>	<b>6,00</b>	<b>13,65</b>	<b>14,00</b>	<b>242,10</b>					

Profili prikazani na slici 58 ukazuju da se preciznija predviđanja koncentracije ibuprofena u plazmi dobijaju korišćenjem *in vitro* profila brzine rastvaranja u kojima je više od 40% lekovite supstance rastvoreno nakon 12 h, odnosno 80% nakon 24 h. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim u Simcyp®-u. Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), dobijenih na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa produženim oslobađanjem u GastroPlus™-u, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 37. Na osnovu prikazanih rezultata može se zapaziti da je najveća sličnost simuliranog i stvarnog profila koncentracije ibuprofena u plazmi, za oba preparata sa produženim oslobađanjem ibuprofena, dobijena kada je kao ulazni profil korišćen eksperimentalni profil brzine rastvaranja ibuprofena u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem pri 20 uranjanja u minuti uz izmenu medijuma.

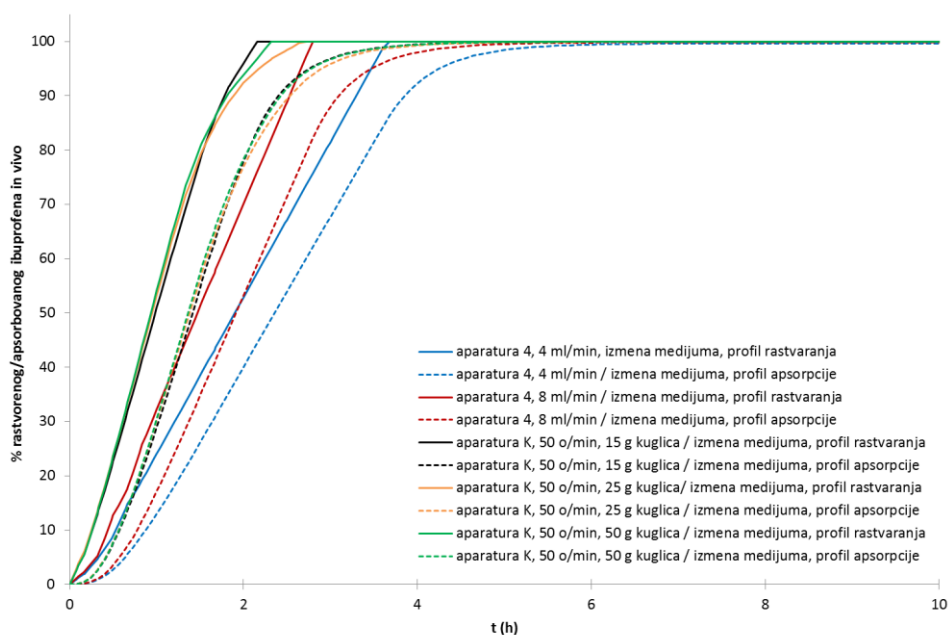
Kada se uporede rezultati dobijeni korišćenjem dva programska paketa, može se uočiti izuzetno dobro poklapanje vrednosti  $C_{max}$  i  $t_{max}$  prvog pika, dok je u GastroPlus™-u zabeleženo ranije pojavljivanje drugog pika i nešto niže vrednosti  $C_{max}$ . Vrednosti  $PIK_{0-t}$  dobijene u GastroPlus™ programskom paketu takođe su niže u poređenju sa vrednostima dobijenim u Simcyp®-u. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa regionalnom promenom permeabilnosti leka u GastroPlus™-u koja je nešto niža u distalnim delovima tankog creva i kolonu (usled nižih vrednosti ASF).

### Identifikacija profila apsorpcije ibuprofena primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

Cilj ovih ispitivanja bio je da se proceni mogućnost primene GastroPlus™ GI simulacije za identifikaciju *in vivo* inputa i njegovu uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i gastrointestinalnom simulacijom u Simcyp®-u.

#### Tablete sa trenutnim oslobađanjem

Na slici 59 prikazani su uporedo *in silico* profili rastvaranja i apsorpcije ibuprofena dobijeni na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila brzine rastvaranja u različitim aparaturnama korišćenjem izmene medijuma.

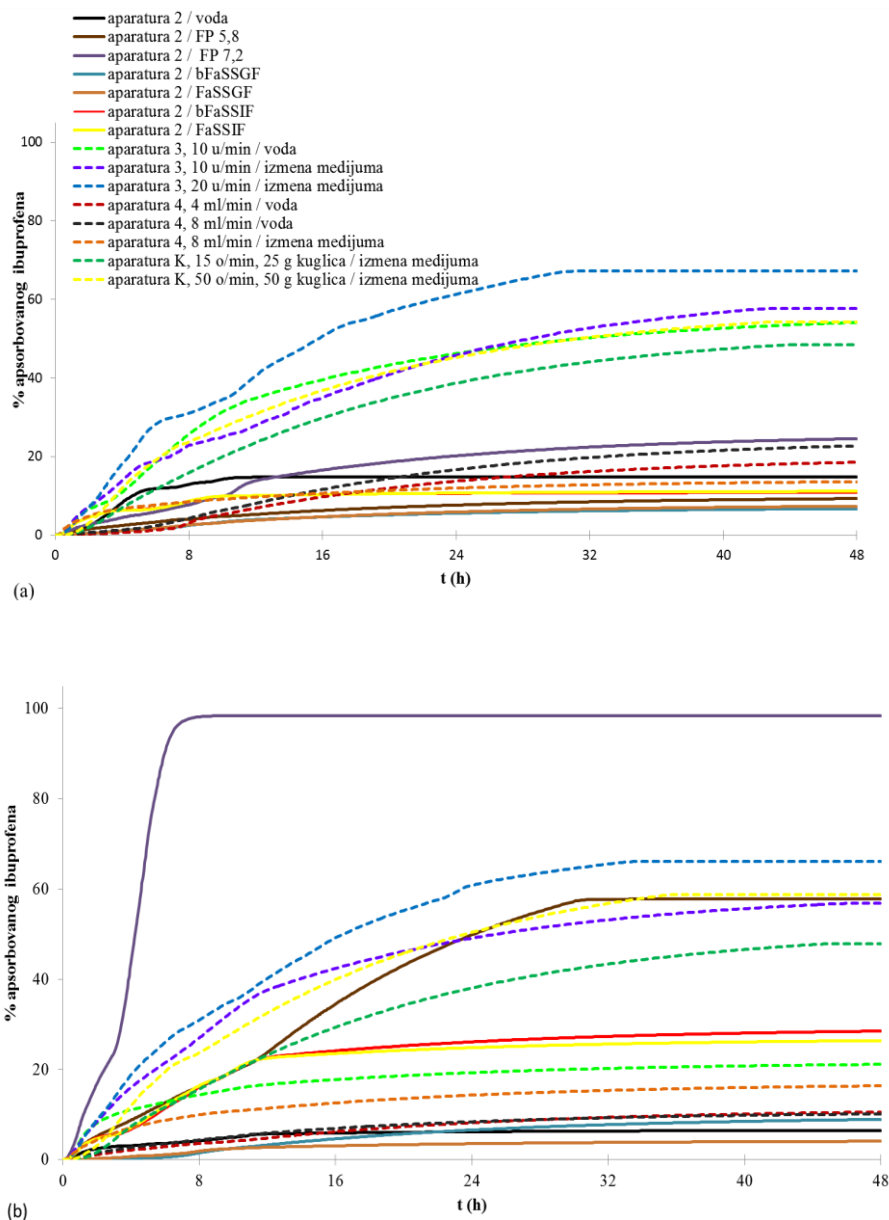


Slika 59. Hipotetički *in vivo* profili rastvaranja i apsorpcije ibuprofena za tablete sa trenutnim oslobađanjem dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u GastroPlus®-u

Prikazani profili ukazuju da je rastvaranje ibuprofena praćeno potpunom apsorpcijom, što je i očekivano s obzirom na visoku permeabilnost ibuprofena. Isti odnos između profila rastvaranja i apsorpcije dobijen je i u simulacijama na osnovu profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom u različitim medijumima.

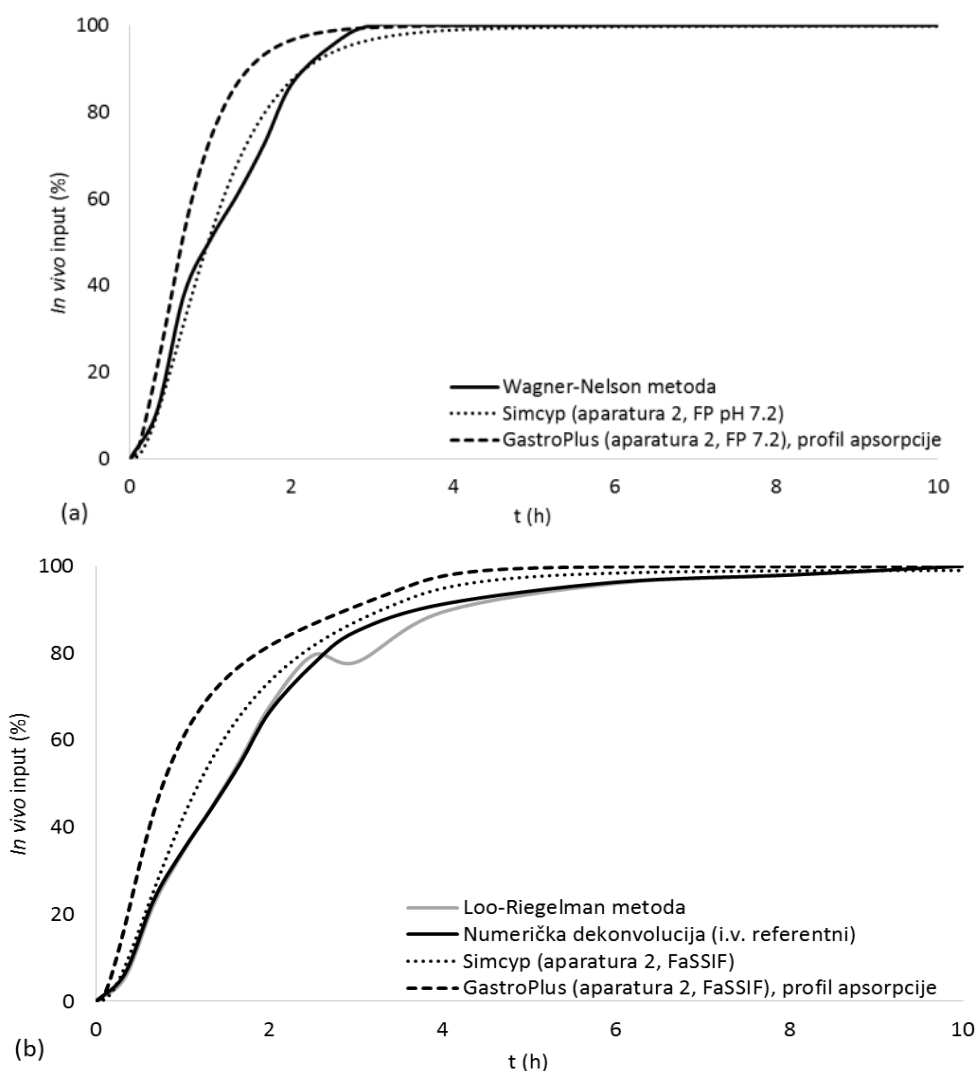
### Tablete sa produženim oslobađanjem

Gastrointestinalnom simulacijom primenom modifikovanog TO modela u GastroPlus®-u na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ibuprofena iz tableta sa produženim oslobađanjem dobijeni su hipotetički input profili ibuprofena. *In vivo* profili apsorpcije ibuprofena prikazani su na slici 60a za tablete sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa, odnosno 60b za tablete sa produženim oslobađanjem tipa lipofilnog matriksa. Simulirani profili apsorpcije pokazuju razlike koje su u skladu sa razlikama između odgovarajućih *in vitro* profila dobijenih pri različitim eksperimentalnim uslovima (slike 47 i 48).



Slika 60. Hipotetički *in vivo* profili apsorpcije ibuprofena dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u GastroPlus®-u, na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja za tablete sa produženim oslobađanjem: (a) tipa hidrofilnog matriksa (preparat I2) i (b) tipa lipofilnog matriksa (preparat I3)

Hipotetički *in vivo* input profili dobijeni konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i gastrointestinalnom simulacijom korišćenjem Simcyp® i GastroPlus™ programskog paketa za tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena prikazani su na slici 61. Profil apsorpcije dobijen u Simcyp®-u korišćenjem *in vitro* profila brzine rastvaranja ibuprofena u aparaturi sa lopaticom i fosfatnom puferu pH 7,2 podudara se sa profilom dobijenim Wagner-Nelson metodom, dok je korišćenjem istog *in vitro* profila u GastroPlus™-u predviđena nešto brža apsorpcija (slika 61a). Profil apsorpcije dobijen u Simcyp®-u u slučaju kada je korišćen *in vitro* profil brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom i FaSSIF-u odgovara profilima dobijenim Loo-Riegelman metodom i numeričkom dekonvolucijom u odnosu na i.v. referentni profil, dok odgovarajući profil u GastroPlus™-u i u ovom slučaju ukazuje na nešto bržu kinetiku apsorpcije (slika 61b). Dobijeni hipotetički profili ukazuju na brzo i potpuno rastvaranje odnosno apsorpciju ibuprofena *in vivo* što je u skladu sa literaturnim podacima (Davies, 1998).

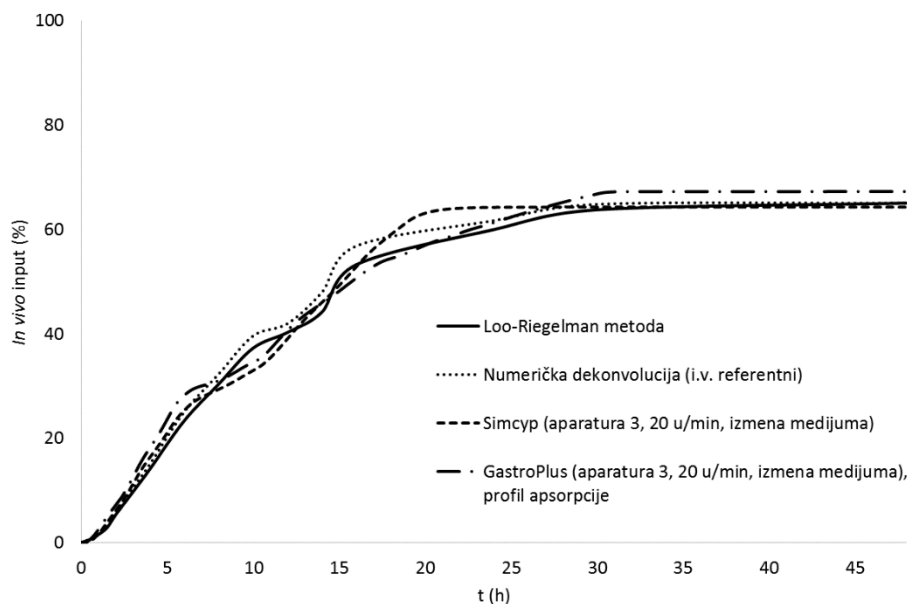


Slika 61. *In vivo* input profili ibuprofena dobijeni različitim metodama dekonvolucije za tablete sa trenutnim oslobađanjem

*In vivo* input profili ibuprofena dobijeni konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom u Simcyp® i GastroPlus™ programskom paketu korišćenjem modifikovanog TO modela za tablete sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa (preparat I2) prikazani su na slici 62. Može se uočiti da se profili apsorpcije dobijeni na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem, pri 20 uranjanja u minuti, uz izmenu medijuma korišćenjem dva programska paketa međusobno podudaraju, kao i sa profilima



dobijenim Loo-Riegelman metode i numeričke dekonvolucije u odnosu na i.v. kao referentni profil. Dobijeni profili apsorpcije ukazuju na ograničenu apsorpciju ibuprofena iz preparata sa produženim oslobađanjem (65%) što je u skladu sa literaturnim podacima (Parr i sar, 1987).



Slika 62. *In vivo* input profili ibuprofena dobijeni primenom različitih metoda dekonvolucije za tablete sa produženim oslobađanjem tipa hidrofilnog matriksa (preparat I2)

#### 4.4.6 *In vitro-in vivo* korelacija

##### Dekonvolucionni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati različitim metodama analizirani su u odnosu na *in vitro* profile brzine rastvaranja ibuprofena iz ispitivanih preparata dobijene pod različitim eksperimentalnim uslovima.

##### Tablete sa trenutnim oslobađanjem

S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale, TS. Hipotetički input profili dobijeni korišćenjem različitih dekonvolucionih metoda, kao i eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja analizirani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Vrednosti faktora TS izračunati su kao odnos  $\tau_{d\text{vivo}}$  i  $\tau_{d\text{vitro}}$  (tabela 38). Može se uočiti da se vrednosti faktora skaliranja vremenske ose značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene dekonvolucione metode kao i *in vitro* profila brzine rastvaranja i kreću se u opsegu 0,007 do 27,60.

Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom za tablete sa trenutnim oslobađanjem nakon korekcije vremenske ose prikazani su u tabeli 39. Visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisan vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0,95, dobijen je u velikom broju slučajeva za profile dobijene u aparaturi sa lopaticom, kao i za sve profile dobijene u dinamičkim modelima za ispitivanje brzine rastvaranja. Najbolja korelacija, odnosno vrednosti nagiba regresione prave približno jedan, kao i visoka vrednost koeficijenta korelacije dobijena je za *in vitro* profile dobijene u dinamičkim modelima za ispitivanje brzine rastvaranja, kao i aparaturi sa lopaticom u fosfatnom puferu pH 7,2, u poređenju sa *in vivo*

profilima dobijenim Wagner-Nelson metodom, numeričkom dekonvolucijom u odnosu na i.v. referentni profil i GI simulacijom korišćenjem oba programska paketa. Dobijeni rezultati potvrđuju da se pored konvencionalne farmakokinetičke analize razvijeni *in silico* modeli mogu uspešno koristiti za identifikaciju *in vivo* input profila ibuprofena, što predstavlja osnov za razvoj bioprediktivnih metoda za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja ibuprofena, kao i postavljanje klinički relevantnih specifikacija.

### **Tablete sa produženim oslobađanjem**

Dekonvolucionni pristup uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije primenjen je i u slučaju tableta sa produženim oslobađanjem ibuprofena.

Ekperimentalno dobijeni *in vitro* profili brzine rastvaranja ibuprofena analizirani su u odnosu na hipotetičke profile izračunate konvencionalnim farmakokinetičkim metodama i gastrointestinalnom simulacijom u Simcyp<sup>®</sup>-u i GastroPlus<sup>™</sup>-u. Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom ispitivanih podataka prikazani su u tabelama 40 i 41, za preparate I2 i I3, redom. U slučaju konvencionalne farmakokinetičke analize, vrednost koeficijenta korelacije veća od 0,95, kao i vrednost nagiba prave približna jedan, je za oba preparata dobijena u slučaju profila brzine rastvaranja ibuprofena u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem pri korišćenju 20 uranjanja u minuti i izmene medijuma i hipotetičkog profila brzine rastvaranja ibuprofena *in vivo* dobijenog numeričkom dekonvolucijom u odnosu na oralni rastvor kao referentni profil.

U slučaju kada su korišćeni hipotetički *in vivo* profili dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u Simcyp<sup>®</sup>-u i GastroPlus<sup>™</sup>-u za oba preparata je u najvećem broju slučajeva dobijena vrednost koeficijenta korelacije veća od 0,95, kao i vrednost nagiba prave približna jedan.

Tabela 38. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem kao i odgovarajući faktori skaliranja vremenske ose

<i>In vitro</i> profil				TS					
Uređaj	Medijum/ Hidrodinamika	$\tau_a$ (h)	$\beta$	Wagner -Nelson metoda	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Numerička dekonvolucija (o.r.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2	bFaSSGF	200	0,34	0,007	0,01	0,009	0,007	0,87	1,47
	FaSSGF	125	0,68	0,011	0,017	0,016	0,012	1,41	3,42
	bFaSSIF	0,19	0,42	6,60	10,09	9,90	7,57	10,73	7,57
	FaSSIF	0,21	0,39	6,06	9,27	9,09	6,95	7,75	5,63
	bFeSSIF	83,3	0,29	0,01	0,023	0,023	0,017	1,93	13,36
	FeSSIF	0,55	0,64	2,33	3,57	3,50	2,67	4,04	5,20
	bFeSSIF/0,5% HPMC	12,0 5	0,52	0,10	0,16	0,16	0,12	27,60	19,11
	FP 5,8 FP 7,2	0,13 0,1	0,27 0,80	9,40 15,42	14,37 23,58	14,10 23,13	10,78 17,69	12,42 15,04	7,96 10,02
Aparatura 4	4 ml/min	2,44	1,45	0,52	0,80	0,79	0,60	1,28	1,14
	8 ml/min	1,81	1,57	0,70	1,07	1,05	0,80	1,37	1,22
Aparatura K	50 o/min, 15 g kuglica	1,29	1,36	0,99	1,51	1,48	1,13	1,45	1,40
	50 o/min, 25 g kuglica	1,23	1,36	1,03	1,58	1,55	1,19	1,55	1,47
	50 o/min, 50 g kuglica	1,20	1,42	1,06	1,63	1,60	1,22	1,60	1,51

Tabela 39. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat II (dekonvolucioni pristup)

Uređaj	<i>In vitro input/ in vivo input</i> Medijum/ Hidrodinamika	Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Wagner- Nelson metoda	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Numerička dekonvolucij a (o.r.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2	bFaSSGF	a	0,9669	0,9462	0,9615	0,8941	0,8889	1,1741
		r	0,8911	0,8831	0,8941	0,8865	0,9266	0,9444
	FaSSGF	a	0,7629	0,6422	0,6483	0,7300	0,6164	0,9990
		r	0,5927	0,5060	0,5079	0,6104	0,8972	0,8259
	bFaSSIF	a	1,3479	1,2775	1,2828	1,2396	1,1422	1,1281
		r	0,9531	0,9607	0,9577	0,9595	0,9993	0,9973
	FaSSIF	a	1,3637	1,3148	1,3203	1,2737	1,3251	1,2918
		r	0,9429	0,9496	0,9472	0,9558	0,9652	0,9737
	bFeSSIF	a	0,7629	0,7634	0,7686	0,7468	0,8047	0,9068
		r	0,5927	0,6056	0,6062	0,6234	0,9337	0,9069
	FeSSIF	a	1,4361	1,3255	1,3810	1,2507	1,2363	1,1553
		r	0,9271	0,9524	0,9308	0,9615	0,9823	0,9713
	bFeSSIF/0,5% HPMC	a	1,0451	1,1146	1,1217	0,9659	1,1022	0,7233
		r	0,9435	0,9687	0,9701	0,9482	0,8295	0,7655
FP 5,8	a	1,3932	1,3305	1,3362	1,2853	1,3247	1,2973	
	r	0,9580	0,9677	0,9641	0,9624	0,9783	0,9779	
FP 7,2	a	1,0202	1,1954	1,0029	1,0308	1,0173	1,0896	
	r	0,9927	0,9975	0,9978	0,9911	0,9967	0,9960	
Aparatura 4	4 ml/min	a	0,9571	0,875	0,9142	0,8701	1,0030	1,0265
		r	0,9876	0,9792	0,9933	0,9835	0,9973	0,9983
	8 ml/min	a	0,9466	0,8606	0,9025	0,8629	1,0151	1,0349
		r	0,9894	0,9812	0,9928	0,9838	0,9966	0,9983
Aparatura K	50 o/min, 15 g kuglica	a	0,9640	0,8836	0,9251	0,8793	1,0452	1,0370
		r	0,9868	0,9820	0,9931	0,9825	0,9939	0,9977
	50 o/min, 25 g kuglica	a	0,9640	0,8837	0,9250	0,8790	1,0414	1,0297
		r	0,9867	0,9820	0,9932	0,9832	0,9950	0,9978
	50 o/min, 50 g kuglica	a	0,9581	0,8780	0,9182	0,8730	1,0323	1,0261
		r	0,9869	0,9820	0,9931	0,9825	0,9957	0,9976

Tabela 40. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat I2 (dekonvolucioni pristup)

Uređaj	<i>In vitro input/ in vivo input</i> Medijum/ Hidrodinamika	Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Wagner- Nelson metoda	Loo- Riegelma n metoda	Numerička dekonvolucij a (i.v.)	Numerička dekonvolucija (o.r.)	Numerička dekonvolucija (p.o.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2	Voda	a	6,7116	3,5503	3,6286	5,5811	5,4393	1,0028	1,1562
		r	0,9048	0,7597	0,7749	0,7851	0,8321	0,9681	0,9766
	FP 5,8	a	6,6252	4,6414	4,6887	6,9687	6,2572	0,9364	0,5507
		r	0,8420	0,9363	0,9266	0,9240	0,9023	0,9990	0,9309
	FP 7,2	a	2,3468	1,6487	1,6672	2,4768	2,2118	0,7593	0,5428
		r	0,8497	0,9475	0,9387	0,9356	0,9087	0,9877	0,9508
	bFaSSGF	a	8,8182	6,0897	6,1680	9,1687	8,1977	0,9213	0,5709
		r	0,8727	0,9566	0,9493	0,9467	0,9206	0,9992	0,9519
	FaSSGF	a	7,3483	5,1924	5,2451	7,7882	6,9264	0,9147	0,5223
		r	0,8371	0,9389	0,9291	0,9257	0,8953	0,9995	0,9460
	bFaSSIF	a	9,8859	5,7064	5,8839	8,8468	8,4935	1,0688	0,9960
		r	0,9439	0,8648	0,8736	0,8813	0,9202	0,9848	0,9884
	FaSSIF	a	9,1802	5,4843	5,6318	8,4498	8,0197	0,9756	0,9316
		r	0,9511	0,9018	0,9073	0,9134	0,9427	0,9813	0,9809
Aparatura 3	Voda/ 10 u/min	a	1,2289	0,8328	0,8451	1,2576	1,1307	0,6948	0,6233
		r	0,8964	0,9642	0,9586	0,9571	0,9358	0,9463	0,9523
	Izmena medijuma/10 u/min	a	1,2032	0,8164	0,8284	1,2328	1,1101	0,6929	0,6185
		r	0,9023	0,9718	0,9660	0,9645	0,9446	0,9547	0,9553
	Izmena medijuma/ 20 u/min	a	1,0162	0,6804	0,6930	1,0322	0,8350	0,6926	0,6627
		r	0,9362	0,9949	0,9928	0,9921	0,9773	0,9828	0,9768
Aparatura 4	Voda/ 4 ml/min	a	2,3005	1,7056	1,7154	2,5411	2,2314	0,6889	0,4484
		r	0,7662	0,9018	0,8885	0,8831	0,8433	0,9882	0,9526
	Voda/ 8 ml/min	a	1,8443	1,3744	1,3812	2,0457	1,7970	0,6286	0,4344
		r	0,7556	0,8938	0,8800	0,8744	0,8354	0,9784	0,9508
	Izmena medijuma/ 8ml/min	a	6,1749	4,1077	4,1665	6,2142	5,7237	1,0042	0,6683
		r	0,8874	0,9370	0,9311	0,9318	0,9334	0,9905	0,9255
Aparatura K	15o/min, 25g kuglica	a	1,1382	0,8060	0,8143	1,2091	1,0756	0,6407	0,5411
		r	0,8430	0,9476	0,9379	0,9343	0,9039	0,9595	0,9550
	50o/min, 50g kuglica	a	1,1796	0,8067	0,8177	1,2163	1,0926	0,6688	0,6167
		r	0,8911	0,9673	0,9605	0,9586	0,9365	0,9525	0,9771

Tabela 41. Statistički parametri *in vitro* - *in vivo* korelacije za preparat I3 (dekonvolucioni pristup)

Uređaj	<i>In vitro</i> input/ <i>in vivo</i> input Medijum/ Hidrodinamika	Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Wagner- Nelson metoda	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Numerička dekonvolucija (o.r.)	Numerička dekonvolucija (p.o.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2	voda	a	14,9620	9,0345	9,2538	14,207	13,2860	1,0062	0,8514
		r	0,9631	0,9468	0,9501	0,9542	0,9705	0,9891	0,9734
	FP 5,8	a	2,4933	1,6233	1,6502	1,3144	2,2741	0,8290	1,2968
		r	0,9165	0,9714	0,9675	0,9070	0,9486	0,9925	0,9757
	FP 7,2	a	0,8285	0,4411	0,4577	0,7071	0,6732	0,9233	0,9912
		r	0,9101	0,7888	0,8019	0,8104	0,8391	0,9842	0,9947
	bFaSSGF	a	4,7334	3,4309	3,4496	5,2404	4,6012	0,8659	0,4440
		r	0,7618	0,8989	0,7841	0,8800	0,8402	0,9995	0,9525
	FaSSGF	a	16,1070	10,4930	10,668	16,2900	14,6440	1,0079	0,6511
		r	0,9145	0,9699	0,9661	0,9650	0,9435	0,9932	0,9621
	bFaSSIF	a	2,7767	1,7344	1,7720	2,7122	2,4699	0,9118	0,7624
		r	0,9551	0,9712	0,9722	0,9734	0,9641	0,9964	0,9770
	FaSSIF	a	3,1795	1,9274	1,9760	3,0292	2,7794	0,9551	0,8309
		r	0,9718	0,9591	0,9632	0,9660	0,9640	0,9965	0,9873
Aparatura 3	Voda/ 10u/min	a	4,4139	2,7406	2,7928	4,2829	3,9992	1,0158	0,7843
		r	0,9279	0,9378	0,9363	0,9692	0,9539	0,9903	0,9492
	Izmena medijuma/10 u/min	a	1,2485	0,8167	0,8294	1,2668	1,1468	0,7052	0,6481
		r	0,9110	0,9701	0,9652	0,9644	0,9495	0,9546	0,9565
	Izmena medijuma/20 u/min	a	1,0931	0,7178	0,7298	1,0145	1,1089	0,7402	0,7231
		r	0,9260	0,9898	0,9860	0,9850	0,9698	0,9879	0,9804
Aparatura 4	Voda/ 4ml/min	a	4,7459	3,3492	3,3722	5,1314	4,5609	0,8732	0,4697
		r	0,8905	0,9112	0,8988	0,8948	0,8649	0,9994	0,9368
	Voda/ 8ml/min	a	6,1343	4,1464	4,1940	6,3959	5,7507	0,9373	0,5597
		r	0,8594	0,9456	0,9371	0,9348	0,9141	0,9995	0,9690
	Izmena medijuma/ 8ml/min	a	4,7539	3,0824	3,1277	4,7823	4,3775	0,9551	0,6565
		r	0,9475	0,9476	0,9420	0,9423	0,9380	0,9957	0,9332
Aparatura K	15o/min, 25g kuglica	a	1,1398	0,7872	0,7952	1,2109	1,0774	0,5951	0,5339
		r	0,8409	0,9455	0,9357	0,9322	0,9020	0,9420	0,9533
	50o/min, 50g kuglica	a	1,1118	0,7424	0,7532	1,1489	1,1313	0,6869	0,8170
		r	0,9037	0,9822	0,9764	0,9743	0,9512	0,9840	0,9634

## Konvolucioni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije, profili koncentracije ibuprofena u plazmi predviđeni primenom gastrointestinalne simulacije u Simcyp® i GastroPlus™ programskim paketima analizirani su u odnosu na srednje farmakokinetičke profile uočene u *in vivo* studiji Källström i sar. (1988) za tablete sa trenutnim oslobađanjem, odnosno Pargal i sar. (1996) za tablete sa produženim oslobađanjem ibuprofena.

### Tablete sa trenutnim oslobađanjem

Statistički parametri linearne regresione analize za tablete sa trenutnim oslobađanjem prikazani su u tabeli 42. Za razliku od podataka dobijenih primenom dekonvolucionog pristupa, analiza IVIVK zasnovana na konvolucionom pristupu dala je nešto drugačije rezultate.

Tabela 42. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena (preparat I1) primenom gastrointestinalne simulacije (konvolucioni pristup)

Uređaj	<i>In vitro</i> profil Medijum/Hidrodinamika	Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
		a	r	a	r
Aparatura 2	bFaSSGF	28,9030	0,9727	30,3960	0,9341
	FaSSGF	35,1810	0,9666	33,6820	0,9341
	bFaSSIF	1,0821	0,9563	1,0401	0,9118
	FaSSIF	1,0812	0,9815	1,0472	0,9581
	bFeSSIF	3,6069	0,9905	3,4331	0,8970
	FeSSIF	1,1600	0,9802	1,1036	0,9174
	bFeSSIF/0,5% HPMC	3,8331	0,9793	4,0398	0,8970
	FP 5,8	1,0572	0,9486	1,0742	0,9472
	FP 7,2	0,8475	0,9783	0,8127	0,9208
Aparatura 4	4 ml/min	0,7733	0,6290	0,8446	0,6622
	8 ml/min	0,7907	0,7636	0,8817	0,8077
Aparatura K	50 o/min, 15 g kuglica	0,8057	0,9048	0,9126	0,9445
	50 o/min, 25 g kuglica	0,8063	0,9128	0,9373	0,9505
	50 o/min, 50 g kuglica	0,8284	0,9131	0,9215	0,9519

a – nagib regresione prave; r – koeficijent korelacije

Iz podataka prikazanih u tabeli 42 vidi se da je primenom konvolucione metode najbolja korelacija predviđenih i *in vivo* uočenih rezultata korišćenjem oba programska paketa postignuta za profil brzine rastvaranja ibuprofena u aparaturi sa lopaticom kada je kao medijum korišćen FaSSIF. Vrednosti koeficijenata korelacije iznosile su 0,9815 za profil predviđen u Simcyp®-u i 0,9581 za profil predviđen u GastroPlus™-u, dok su odgovarajući nagibi regresione prave 1,0812 odnosno 1,0472. Dobra korelacija je dobijena i u slučaju profila koncentracije ibuprofena u plazmi simuliranog u GastroPlus™-u na osnovu *in vitro* rezultata brzine rastvaranja u aparaturi sa staklenim kuglicama korišćenjem izmene medijuma (a = 0,9373, r = 0,9505 u slučaju kada je korišćeno 25 g kuglica; a = 0,9215, r = 0,9519 u slučaju kada je korišćeno 50 g kuglica). Ostali profili su pokazali značajna odstupanja u odnosu na *in vivo* uočen profil koncentracije lekovite supstance u plazmi.

### Tablete sa produženim oslobađanjem

Statistički parametri linearne regresione analize za tablete sa produženim oslobađanjem ibuprofena prikazani su u tabeli 43 za preparat I2, odnosno tabeli 44 za preparat I3.

Tabela 43. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za tablete sa produženim oslobađanjem ibuprofena (preparat I2) primenom gastrointestinalne simulacije (konvolucioni pristup)

<b>In vitro profil</b>		<b>Simcyp®</b>		<b>GastroPlus™</b>	
Uređaj	Medijum/Hidrodinamika	<b>a</b>	<b>r</b>	<b>a</b>	<b>r</b>
Aparatura 2	Voda	1,5031	0,6170	1,3386	0,6169
	FP 5,8	7,0189	0,8858	7,3630	0,8523
	FP 7,2	2,2673	0,9506	2,7249	0,9489
	bFaSSGF	7,2862	0,9395	7,8868	0,9195
	FaSSGF	7,3960	0,9450	8,0595	0,9270
	bFaSSIF	1,1866	0,3337	0,9859	0,2567
	FaSSIF	1,2455	0,3478	1,1298	0,2901
Aparatura 3	Voda/ 10 u/min	0,9608	0,9141	0,9822	0,8628
	Izmena medijuma/ 10 u/min	0,9657	0,9305	1,0642	0,7315
	Izmena medijuma/ 20 u/min	0,8000	0,9632	0,8379	0,9311
Aparatura 4	Voda/ 4 ml/min	2,3515	0,8214	2,8278	0,8350
	Voda/ 8 ml/min	2,3111	0,8641	2,8255	0,8868
	Izmena medijuma/8ml/min	1,1109	0,2961	0,7539	0,1794
Aparatura K	15 o/min, 25 g kuglica	1,1626	0,9614	1,2821	0,9526
	50 o/min, 50 g kuglica	0,9616	0,9534	0,7725	0,9594

Tabela 44. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za tablete sa produženim oslobađanjem ibuprofena (preparat I3) primenom gastrointestinalne simulacije (konvolucioni pristup)

<b>In vitro profil</b>		<b>Simcyp®</b>		<b>GastroPlus™</b>	
Uređaj	Medijum/Hidrodinamika	<b>a</b>	<b>r</b>	<b>a</b>	<b>r</b>
Aparatura 2	Voda	0,8609	0,4513	3,4814	0,4269
	FP 5,8	1,7810	0,9331	1,3898	0,9662
	FP 7,2	0,1503	0,5169	0,1550	0,5298
	bFaSSGF	4,9677	0,8171	5,9757	0,8293
	FaSSGF	9,5799	0,8814	9,8406	0,8473
	bFaSSIF	1,5073	0,8776	1,4939	0,8112
	FaSSIF	1,4925	0,8589	1,4667	0,7931
Aparatura 3	Voda/10 u/min	0,7585	0,3588	0,6287	0,2727
	Izmena medijuma/10 u/min	0,9846	0,9341	1,0151	0,8798
	Izmena medijuma/20 u/min	0,8578	0,9487	0,9044	0,9118
Aparatura 4	Voda/4 ml/min	6,9843	0,9716	7,9496	0,9620
	Voda/8 ml/min	6,3006	0,9389	6,6415	0,8921
	Izmena medijuma/8ml/min	1,8927	0,5455	1,7894	0,4710
Aparatura K	15o/min, 25g kuglica	1,1762	0,9641	1,2955	0,9545
	50o/min, 50g kuglica	0,9132	0,9661	0,9611	0,9392

Najbolja korelacija predviđenih i stvarnih profila koncentracije ibuprofena u plazmi u slučaju oba preparata postignuta je za profile simulirane u Simcyp®-u na osnovu *in vitro* rezultata u aparaturi sa staklenim kuglicama pri 50 obrataja u minuti i 50 g kuglica uz korišćenje izmene medijuma. Vrednosti koeficijenta korelacije iznose 0,9534 za preparat I2 i 0,9661 za preparat I3, dok nagibi regresione prave iznose 0,9616 za preparat I2 odnosno 0,9132 za preparat I3.

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja pod različitim eksperimentalnim uslovima ukazuju na značaj razmatranja uticaja pH vrednosti medijuma u slučaju tableta sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena, u skladu sa pH-zavisnom rastvorljivošću lekovite supstance, dok je u slučaju preparata sa produženim oslobađanjem pored pH vrednosti, od velikog značaja i izbor aparature, odnosno uticaj hidrodinamičkih uslova. Primenom dekonvolucionog pristupa bilo je



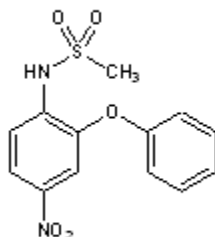
moguće uspostaviti visok stepen korelacije između hipotetičkih *in vivo* input profila i rezultata dobijenih ispitivanjem brzine rastvaranja *in vitro*. U slučaju tableta sa trenutnim oslobađanjem, najmanje greške predviđanja relevantnih farmakokinetičkih parametara zabeležene su u slučaju kada je kao ulazni *in vitro* profil korišćen eksperimentalno određen profil brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje fosfatnog pufera pH 7,2 gde je zabeleženo veoma brzo rastvaranje ibuprofena. Odlična predviđanja obima i brzine apsorpcije ibuprofena dobijena su i korišćenjem profila dobijenih u aparaturi sa lopaticom i FaSSIF medijumu, i profila dobijenih u aparaturi sa staklenim kuglicama uz korišćenje izmene medijuma. U pomenutim slučajevima rastvoreno je više od 55% ibuprofena nakon 60 min, te bi se navedeno moglo predložiti kao klinički relevantna specifikacija za tablete sa trenutnim oslobađanjem ibuprofena.

Kada se posmatraju rezultati ispitivanja brzina rastvaranja ibuprofena iz preparata sa produženim oslobađanjem za koje je u *in vivo* studiji pokazano da su biološki ekvivalentni, može se uočiti da je većina ispitivanih eksperimentalnih uslova isuviše diskriminativna i ukazuje na razlike između preparata koje nisu relevantne *in vivo*. To je posebno izraženo u aparaturi sa lopaticom gde su zabeležene najizraženije razlike između ispitivanih preparata. Slični profili između ispitivanih preparata dobijeni su jedino korišćenjem dinamičkih uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja (i to u aparaturi 3, pri korišćenju 20 uranjanja u minuti uz izmenu medijuma, u aparaturi 4, pri korišćenju protoka od 8 ml/min uz izmenu medijuma, i u aparaturi sa staklenim kuglicama, pri korišćenju 50 obrtaja u minuti i 50 g kuglica uz izmenu medijuma). Dobijeni rezultati ukazuju na prednost korišćenja dinamičkih modela u razvoju bioprediktivne metode za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata sa produženim oslobađanjem.

Primenom metodologije gastrointestinalne simulacije pokazano je da se na osnovu izabranog seta ulaznih podataka (fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine ibuprofena) sa zadovoljavajućom tačnošću može predvideti profil koncentracije ibuprofena u plazmi nakon oralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem. Uz manja prilagođavanja u pogledu klirensa i vremena zadržavanja leka u kolonu, razvijeni model je uspešno korišćen i za modelovanje farmakokinetičkog profila preparata sa produženim oslobađanjem ibuprofena. Rezultati gastrointestinalne simulacije su pokazali da se preciznija predviđanja profila koncentracije ibuprofena u plazmi dobijaju korišćenjem *in vitro* profila brzine rastvaranja kod kojih je više od 40% leka rastvoreno nakon 12 h. Najmanje greške predviđanja, za oba ispitivana preparata sa produženim oslobađanjem, zabeležena su u slučaju kada se kao ulazni parametar koristi profil brzine rastvaranja ibuprofena u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem (aparatura 3) pri korišćenju eksperimentalne postavke od 20 uranjanja/min uz izmenu medijuma, kao i *in vitro* profil brzine rastvaranja ibuprofena u aparaturi sa staklenim kuglicama pri korišćenju eksperimentalne postavke 50 obrtaja u minuti i 50 g staklenih kuglica uz izmenu medijuma.

Procenom mogućnosti uspostavljanja IVIVK primenom dekonvolucionog i konvolucionog pristupa analizi podataka pokazano je da se u slučaju preparata sa ibuprofenom dolazi do nešto drugačijih zaključaka. Primenom dekonvolucione metode najbolja korelacija, odnosno vrednosti nagiba regresione prave približno broju jedan, kao i visoka vrednost koeficijenta korelacije dobijena je za sve *in vitro* profile dobijene u dinamičkim modelima za ispitivanje brzine rastvaranja, kao i u aparaturi sa lopaticom u fosfatnom puferu pH 7,2. Sa druge strane, primenom konvolucione metode najbolja korelacija predviđenih i *in vivo* uočenih rezultata postignuta je za profil brzine rastvaranja ibuprofena dobijen u aparaturi sa lopaticom kada je kao medijum korišćen FaSSIF. Oba pristupa su za oba ispitivana preparata potvrdila visok nivo korelacije između *in vitro* profila dobijenih u aparaturi sa cilindrom sa povratnim kretanjem (aparatura 3) pri korišćenju eksperimentalne postavke od 20 uranjanja/min i izmene medijuma i *in vitro* profila dobijenog u aparaturi sa staklenim kuglicama pri korišćenju eksperimentalne postavke 50 obrtaja u minuti i 50 g staklenih kuglica i izmene medijuma u poređenju sa profilima koji su dobijeni gastrointestinalnom simulacijom.

## 4.5 MODEL SUPSTANCA: NIMESULID



N-(4-nitro-2-fenoskifenil)metansulfonamid

Slika 63. Strukturna formula i hemijski naziv nimesulida

Nimesulid je nesteroidni antiinflamatorni lek iz grupe selektivnih inhibitora ciklooksigenaze-2 koji pokazuje analgetička, antipiretička i antiinflamatorna svojstva (Bernareggi, 1998). Uobičajno se primenjuje u pojedinačnoj dozi od 100 mg, dva puta dnevno (posle jela), kod inflamatornih stanja, kao što su povišena telesna temperatura i bolovi različite etiologije (Nacionalni registar lekova, 2022).

### 4.5.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva nimesulida

Nimesulid pokazuje slabo kisela svojstva sa konstantom disocijacije pKa 6,5. U fiziološkom opsegu pH vrednosti pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost i na pH 1,0 iznosi 0,012 mg/ml, na pH 6,8 iznosi 0,028 mg/ml, dok na pH 7,4 iznosi 0,083 (Dellis i sar, 2007; Singh i sar, 1999; Rainsford, 2005). Particioni koeficijent oktanol/voda iznosi 2,5 (Rainsford, 2005). Meriani i sar. (2004) su ispitivali permeabilnost nimesulida na izolovanom crevu pacova i pokazali da ova lipofilna supstanca prolazi kroz intestinalnu membranu pasivnom difuzijom, pri čemu je određena vrednost  $P_{eff}$  bila  $1,7 \pm 0,4 \cdot 10^{-4}$  cm/s. Ispitivanjem biološke raspoloživosti pokazano je da je stepen apsorpcije nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem koje sadrže 200 mg nimesulida iznosi 92,2% (Singh i sar, 2001). Prema napred navedenim podacima, a u skladu sa kriterijumima BCS, nimesulid se klasifikuje kao lekovita supstanca koja pripada klasi 2 BCS.

Nimesulid se brzo apsorbuje nakon oralne primene (maksimalne koncentracije u plazmi dostižu se 1-3 h nakon primene) (Rainsford i sar, 2005). Ispitivanje regionalne apsorpcije nimesulida korišćenjem Intelisite® kapsula u kombinaciji sa  $\gamma$ -scintigrafijom je pokazalo da se nimesulid značajno apsorbuje u želucu i proksimalnom delu tankog creva gde se apsorbuje oko 40% rastvorene lekovite supstance, dok se u distalnim delovima tankog creva apsorbuje oko 50%, a u kolonu manje od 10% (Pharmaceutical profiles study number PPL-332, 1999).

Nimesulid se u visokom procentu vezuje za proteine plazme (96-99%) (Bernareggi, 1998; Pulkkinen i Vuento, 1991). Glavni put eliminacije je metabolizam u jetri pomoću citohroma P450 (Rainsford, 2005). Poluvreme eliminacije se kreće u opsegu 2 do 5 h za nimesulid, odnosno 3 do 9 h za glavni metabolit koji takođe pokazuje aktivnost. Prisustvo hrane ne utiče značajno na obim i brzinu apsorpcije nimesulida iz oralno primenjenih preparata (Bernareggi, 1998; Rainsford, 2005).

## 4.5.2 *In vivo* podaci

U cilju biofarmaceutske karakterizacije izvršen je detaljan pregled *in vivo* studija za različite formulacije preparata sa trenutnim oslobađanjem nimesulida dostupnih u literaturi. Uvidom u dostupne podatke izabran je literaturni profil koncentracije nimesulida u plazmi nakon oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem (Jovanović i sar, 2005).

Jovanović i sar. (2005) su u randomizovanoj, dvostruko slepoj studiji ispitivali farmakokinetiku i relativnu biološku raspoloživost tri preparata sa trenutnim oslobađanjem nimesulida. Pokazano je da su preparati, uprkos razlikama u formulaciji, biološki ekvivalentni čime su pokazali da se u praksi ne očekuju razlike u terapijskom efektu ispitivanih preparata. Farmakokinetički parametri tableta sa trenutnim oslobađanjem nimesulida prikazani su u tabeli 45.

Tabela 45. Farmakokinetički parametri tableta sa trenutnim oslobađanjem nimesulida

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> (µg/h/ml)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	Referenca
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (100 mg)	26,56	4,11	2,8	2,8	Jovanović i sar, 2005

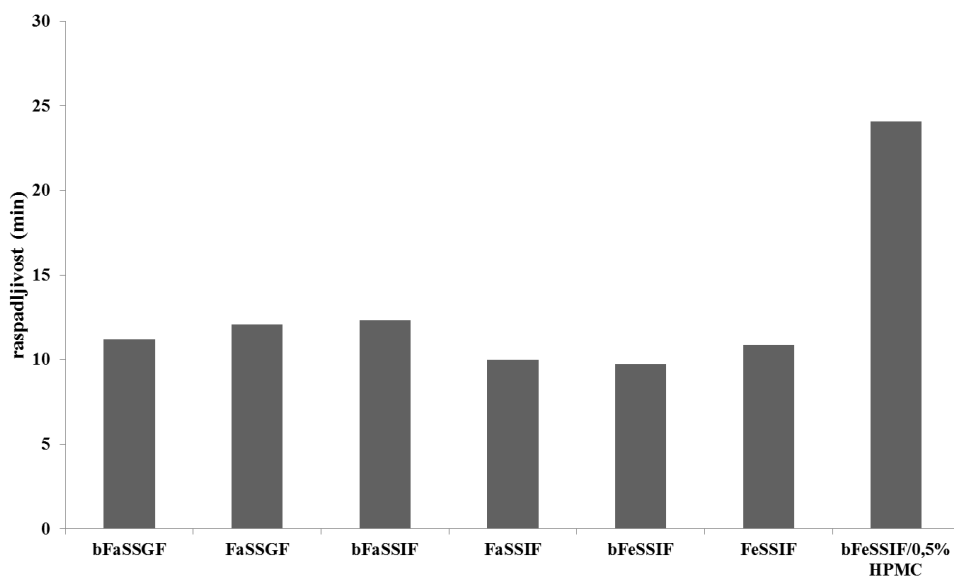
## 4.5.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila nimesulida dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

S obzirom da *in vivo* podaci dobijeni nakon i.v. primene nimesulida, odnosno primene nimesulida u obliku rastvora nisu dostupni u literaturi, njegovo rastvaranje, odnosno apsorpciju u organizmu nije moguće analizirati primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda kao što su numerička dekonvolucija i metoda Loo Riegelman-a. Primena Wagner-Nelson metode je takođe isključena s obzirom da nimesulid pokazuje trieksponencijalnu raspodelu lekovite supstance koju nije moguće opisati jednodimenzionalnim modelom (Bernareggi, 1998).

## 4.5.4 *In vitro* ispitivanja

### Raspadljivost tableta

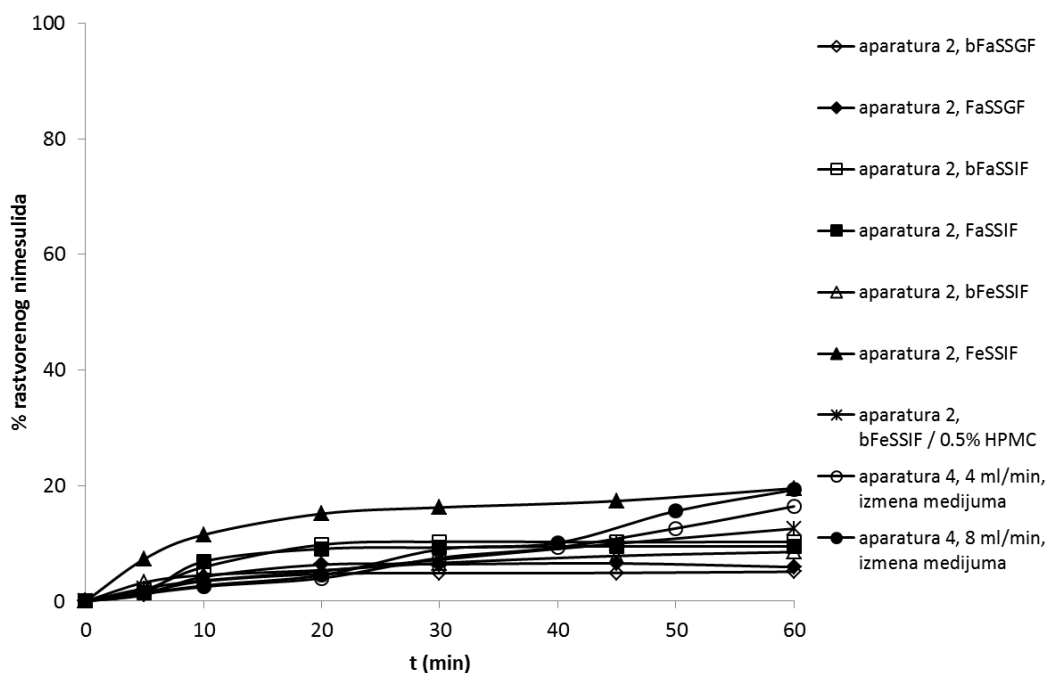
Na slici 64 prikazani su rezultati ispitivanja raspadljivosti tableta sa trenutnim oslobađanjem nimesulida. Uočeno je da se tablete u neviskoznim medijumima raspadaju za oko 11 min, kao i da sastav i pH vrednost medijuma ne utiču značajno na raspadljivost tableta. Dodatak HPMC-a u medijum udvostručuje vreme potrebno za raspadanje tableta sa trenutnim oslobađanjem nimesulida (raspadljivost je 24 min).



Slika 64. Raspodljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem nimesulida u različitim medijumima

### Brzina rastvaranja nimesulida iz tableta

Važeće farmakopeje i smernice izdate od strane regulatornih organa ne navode eksperimentalne uslove za ispitivanje brzine rastvaranja nimesulida iz tableta. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja nimesulida iz tableta sa trenutnim oslobađanjem u aparaturi sa lopaticom u različitim medijumima i aparaturi sa protočnom ćelijom uz korišćenje izmene medijuma (15 min bFaSSGF / 45 min bFaSSIF) prikazani su na slici 65.



Slika 65. Profili brzine rastvaranja nimesulida iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćenjem različitih aparatura i medijuma

Prikazani rezultati ilustruju da se nimesulid, bez obzira na vrstu medijuma, u aparaturi sa lopaticom rastvara sporo i nepotpuno. Jasan plato u profilima brzine rastvaranja u saglasnosti je sa niskom rastvorljivošću nimesulida pri pH vrednostima ispitivanih medijuma i ukazuje da je

niska rastvoljivost nimesulida ograničavajući faktor za rastvaranje iz date formulacije. U medijumu sa značajnijom koncentracijom fizioloških surfaktanata (FeSSIF) neznatno je povećan i obim i brzina rastvaranja nimesulida iz tableta što je u saglasnosti sa rezultatima Grbić (2011).

U aparaturi sa protočnom ćelijom zabeležena je nešto drugačija kinetika rastvaranja nimesulida u poređenju sa rezultatima dobijenim u aparaturi sa lopaticom. Naime, iako je nakon 60 min postignut isti obim rastvaranja nimesulida iz tableta, jasno se može uočiti da nije postignut plato i može se zaključiti da će konstantan priliv svežeg medijuma rezultovati daljim rastvaranjem nimesulida iz tableta korišćenjem aparature sa protočnom ćelijom. Dobijeni rezultati ukazuju na značaj zapremine medijuma koji se koristi u ispitivanju brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitih supstanci, kao i da se potpuno rastvaranje ne može postići čak ni u slučaju kada se koriste fiziološki zasnovani medijumi ukoliko se koristi ograničena zapremina medijuma i nisu obezbeđeni *sink* uslovi, kao što je to slučaj u aparaturi sa lopaticom.

#### 4.5.5 *In silico* ispitivanja

U okviru ovog poglavlja biće opisana gastrointestinalna simulacija apsorpcije nimesulida iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćenjem programskih paketa Simcyp® i GastroPlus™, u cilju mehanističke interpretacije apsorpcije nimesulida, identifikacije bioprediktivne metode i postavljanja klinički relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja.

##### 4.5.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa

###### Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije nimesulida iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa Simcyp® Population - Based Simulator (verzija 13.2, Certara™, SAD). Simulacija apsorpcije sprovedena je korišćenjem fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 46, čije su vrednosti preuzete iz literature ili su *in silico* predviđene. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja nimesulida iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. Validacija modela sprovedena je na osnovu srednjeg profila koncentracije nimesulida u plazmi iz studije Jovanović i sar. (2005).

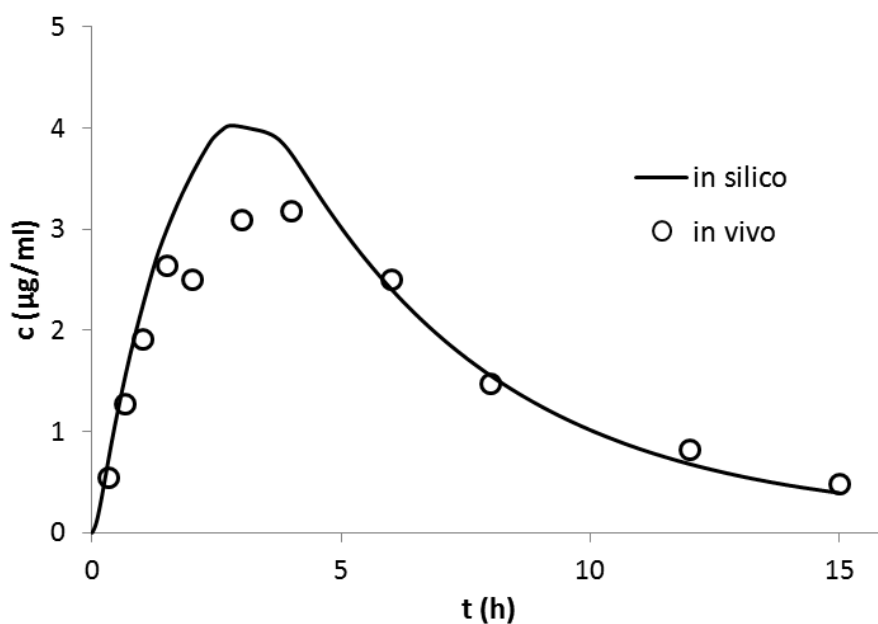
Apsorpcija nimesulida iz GI trakta simulirana je korišćenjem ADAM modela. U simulacijama je korišćena eksperimentalno određena vrednost permeabilnosti nimesulida (koja iznosi  $1,7 \cdot 10^{-3}$  cm/s) iz studije Meriani i sar. (2004), dok su vrednosti efektivnih permeabilnosti u ileumu i kolonu optimizovane korišćenjem Simcyp® Parameter Estimation opcije i iznose  $9,0 \cdot 10^{-4}$  cm/s, odnosno  $4,5 \cdot 10^{-4}$  cm/s redom. Nimesulid u fiziološkom opsegu pH vrednosti pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost, te je u simulacijama korišćen pH-zavisni profil rastvorljivosti iz studije Rainsford (2005). Volumen distribucije predviđen je u Simcyp®-u na osnovu *potpuni PBPK* modela distribucije i metode Rodgers i Rowland (metoda 2) i iznosi 0,158 L/kg što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Rainsford, 2005). ASA je pokazala da vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$  umnogome zavise od veličine čestica lekovite supstance te je ovaj parametar optimizovan korišćenjem Simcyp® Parameter Estimation opcije tako da se postigne najmanje odstupanje simuliranog u odnosu na *in vivo* uočeni profil koncentracije nimesulida u plazmi. Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca Sim-Healthy Volunteers populacije.

Simulirani profil koncentracije nimesulida u plazmi na osnovu ulaznih parametara prikazanih u tabeli 46 u saglasnosti je sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Jovanović i sar, 2005) što je prikazano na slici 66, a potvrđeno izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), prikazanih u tabeli 47.

Tabela 46. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije nimesulida

Parametar (jedinica mere)	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	308,31
$\log P_{o:w}$	2,5 <sup>a</sup>
Jednobazna kiselina	
pKa	6,4 <sup>b</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>c</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, $f_u$	0,04 <sup>d</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, $P_{eff}$ (cm/s)	$17,0 \cdot 10^{-4}$ <sup>e</sup>
pH-zavisni profil rastvorljivosti (mg/ml)	0,012 na pH 1,0 0,028 na pH 6,8 0,083 na pH 7,4 <sup>b</sup>
Konstanta precipitacije ( $h^{-1}$ )	4 <sup>c</sup>
Radius čestica lekovite supstance ( $\mu m$ )	5 <sup>f</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>c</sup>
Distribucija	
Potpuni PBPK model, metoda 1	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, $V_{ss}$ (L/kg)	0,158 <sup>g</sup>
Eliminacija	
$CL_{po}$ (L/h)	3,62 <sup>b</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	100
Vreme simulacije (h)	15
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250

<sup>a</sup> Podatak iz literature (Rainsford, 2005); <sup>b</sup> Podatak iz literature (Dellis i sar, 2007); <sup>c</sup> Simcyp<sup>®</sup> vrednost; <sup>d</sup> Podatak iz literature (Bernareggi, 1998); <sup>e</sup> Podatak iz literature (Meriani i sar, 2004); <sup>f</sup> Predviđena vrednost korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> Parameter Estimation opcije; <sup>g</sup> Vrednost izračunata u Simcyp<sup>®</sup>-u korišćenjem potpunog PBPK modela distribucije

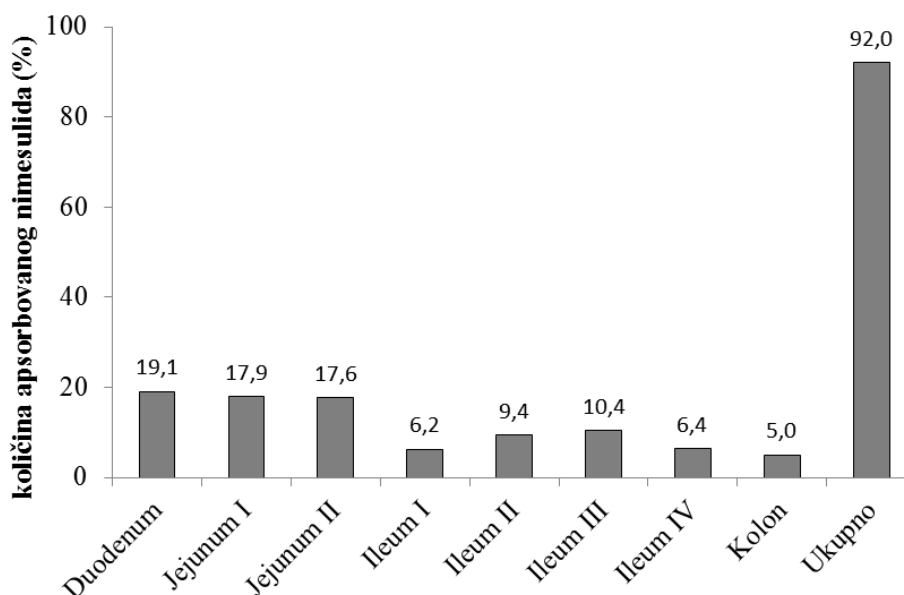


Slika 66. Simulirani profil koncentracije nimesulida u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na *in vivo* profil

Tabela 47. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih greški predviđanja za tablete sa trenutnim oslobađanjem nimesulida

Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{max}$ (µg/ml)	3,32	4,02	21,08
$t_{max}$ (h)	3,68	2,78	24,45
$PIK_{0-t}$ (µgh/ml)	23,82	27,62	15,95

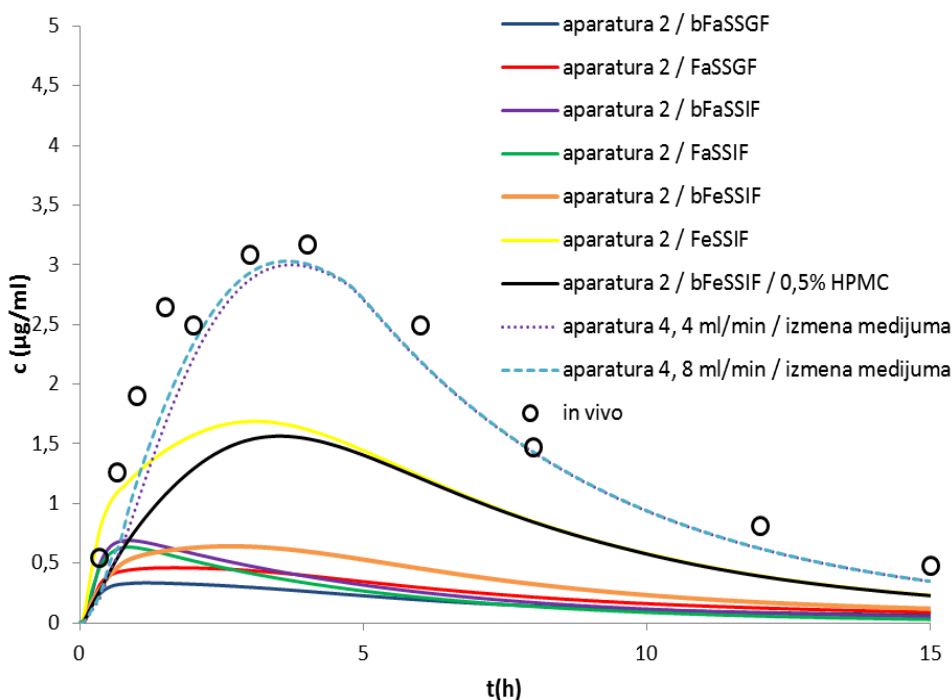
Na osnovu simuliranog profila regionalne apsorpcije nimesulida iz digestivnog trakta (slika 67) vidi se da se najveća količina nimesulida, primenjenog u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem, apsorbuje u proksimalnom delu tankog creva (oko 37%) i distalnom delu tankog creva (oko 50%), dok je apsorpcija u kolonu zanemarljiva (5%). Ukupni procenat apsorbovane lekovite supstance iznosi 92%. Dobijeni rezultati u potpunosti su u saglasnosti sa rezultatima regionalne apsorpcije koji su dobijeni u *in vivo* studiji korišćenjem Intelisite® kapsula (Pharmaceutical profiles study number PPL-332, 1999), govoreći u prilog zadovoljavajućem predviđanju razvijenog modela. Predviđeni obim apsorpcije leka od 92% je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na dobru biološku raspoloživost nimesulida nakon oralne primene (Singh i sar, 2001).



Slika 67. Simulirana regionalna apsorpcija nimesulida

### Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Kako bi se ispitaio uticaj *in vitro* brzine rastvaranja na profil koncentracije nimesulida u plazmi u funkciji vremena, eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja nimesulida iz tableta korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije. Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 68, a izabrani farmakokinetički parametari ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 48.



Slika 68. Simulirani profili koncentracije nimesulida u plazmi osnove eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta sa trenutnim oslobađanjem zajedno sa *in vivo* uočenim profilom

Simulirani profili prikazani na slici 68 ukazuju da na rezultate GI simulacije značajno utiče ulazni *in vitro* profil brzine rastvaranja nimesulida iz tableta. Na osnovu prikazanih profila može se uočiti da se preciznije predviđanje koncentracije nimesulida u plazmi dobija ukoliko se koriste *in vitro* profili brzine rastvaranja dobijeni u protočnoj ćeliji uz izmenu medijuma, u poređenju sa profilima dobijenim u aparaturi sa lopaticom.

Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), dobijeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja nimesulida iz tableta, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 48. Na osnovu prikazanih rezultata najbolje slaganje simuliranog i stvarnog profila koncentracije nimesulida u plazmi može se uočiti u slučaju kada se kao ulazni profil koristi eksperimentalno određen profil brzine rastvaranja u aparaturi sa protočnom ćelijom, pri brzini protoka od 8 ml/min, uz izmenu medijuma.

Tabela 48. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja nimesulida iz tableta i odgovarajuće greške predviđanja

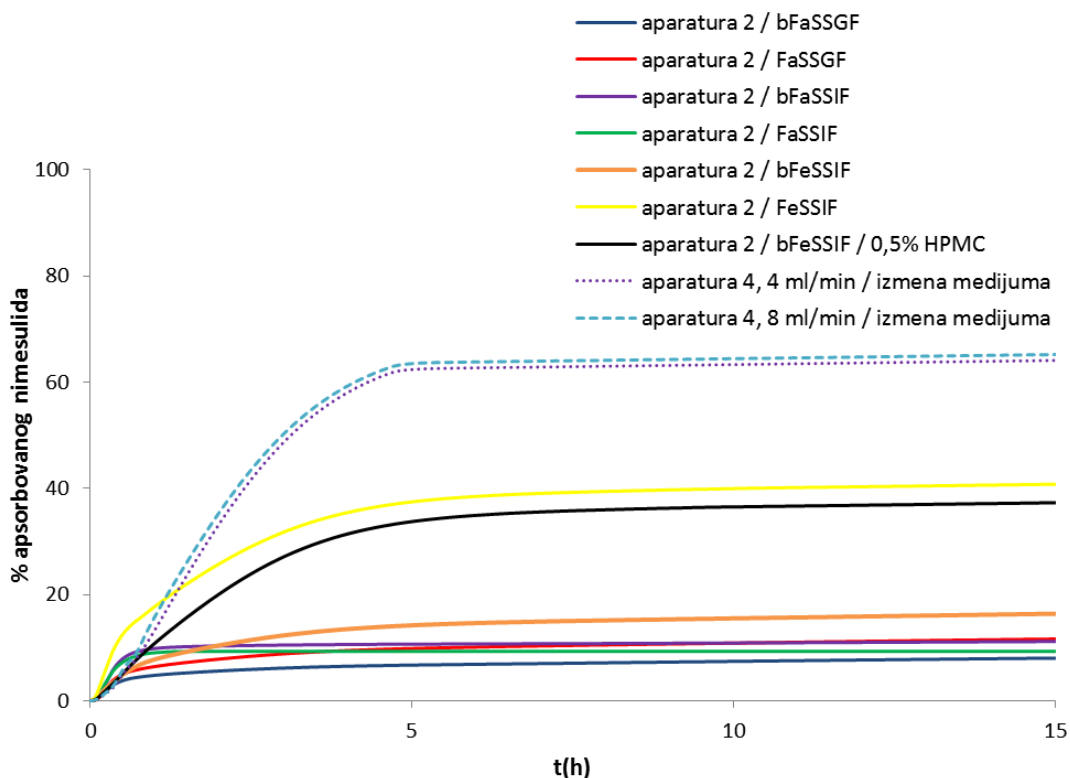
<b><i>In vitro</i> profil</b>		<b><math>C_{max}</math></b>	<b>%PE</b>	<b><math>t_{max}</math></b>	<b>%PE</b>	<b><math>PIK_{0-t}</math></b>	<b>%PE</b>
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
Aparatura 2	bFaSSGF	0,30	90,96	1,35	63,31	3,28	86,23
	FaSSGF	0,39	88,25	1,83	50,27	4,53	80,98
	bFaSSIF	0,58	82,53	1,02	72,28	4,02	83,12
	FaSSIF	0,59	82,22	1,05	71,46	3,25	86,35
	bFeSSIF	0,59	82,22	2,95	19,83	6,45	72,92
	FeSSIF	1,55	53,31	3,5	4,89	14,52	39,04
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,49	55,12	3,85	4,61	13,85	41,85
Aparatura 4	4 ml/min	2,88	13,25	4,02	9,23	22,55	5,33
	8 ml/min	2,95	11,14	3,95	7,33	23,85	0,12
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>3,32</b>	<b>/</b>	<b>3,68</b>	<b>/</b>	<b>23,82</b>	<b>/</b>



## Identifikacija profila apsorpcije nimesulida primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija apsorpcije nimesulida iz tableta sprovedena je korišćenjem prethodno razvijenog i validiranog modela gastrointestinalne simulacije. Cilj ovih simulacija je procena mogućnosti primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila i uporednu analizu sa rezultatima dobijenim GastroPlus™ gastrointestinalnom simulacijom.

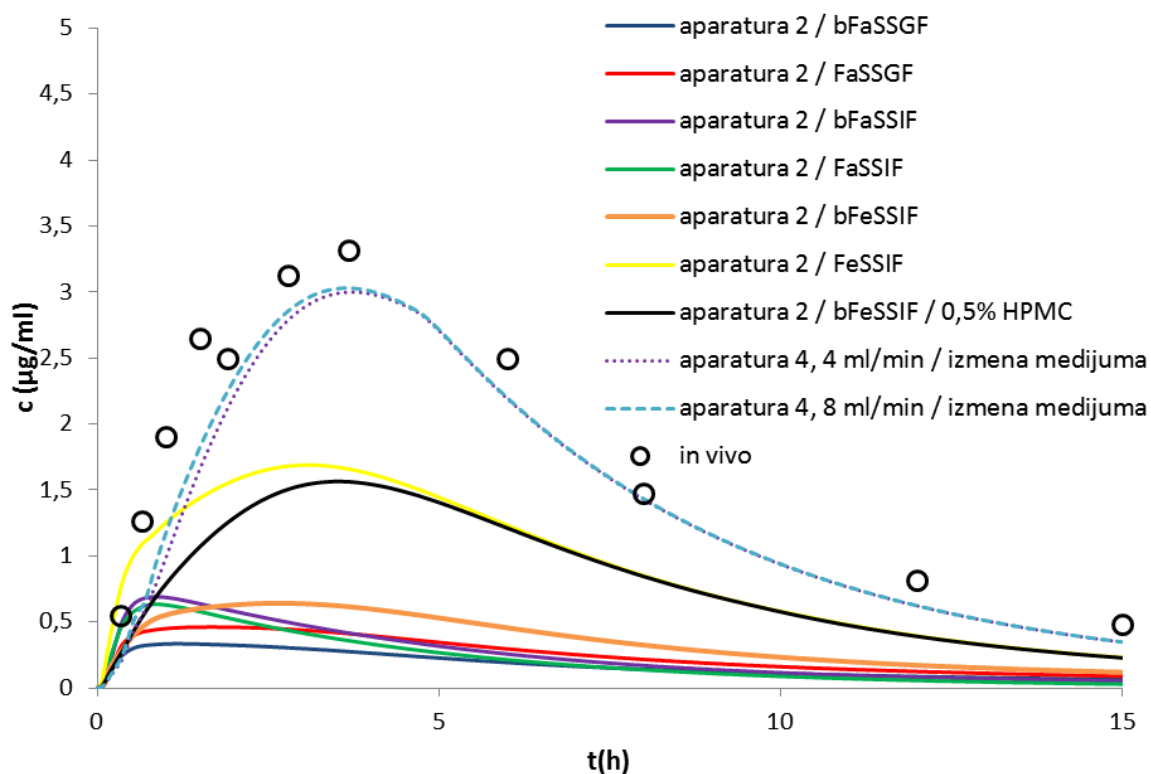
*In silico* profili apsorpcije nimesulida iz tableta dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 69. Može se uočiti da svi profili brzine rastvaranja predviđaju niži obim apsorpcije od onog koji je zabeležen *in vivo*.



Slika 69. Hipotetički profili apsorpcije nimesulida na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta sa trenutnim oslobađanjem

### 4.5.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja vrednosti ulaznih parametara prikazane u tabeli 46 korišćene su u okviru komercijalno dostupnog GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) programskog paketa. Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija, izuzev ASF faktora koji je optimizovan i iznosi 15 u duodenumu, jejunumu I i II, 3 u ileumu I, II i III, odnosno 0,1 u cekumu i kolonu. Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode Rodgers i Rowland kao i u slučaju Simcyp®-a, i dobijena je vrednost od 0,167 L/kg što odgovara vrednosti predviđenoj u Simcyp®-u gde je predviđen volumen distribucije od 0,158 L/kg.



Slika 70. Profili koncentracije nimesulida u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta i profil uočen *in vivo*

Simulirani profili koncentracije nimesulida u plazmi dobijeni GI simulacijom u GastroPlus®-u na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta pod različitim eksperimentalnim uslovima prikazani su na slici 70. Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), dobijene na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja nimesulida iz tableta u GastroPlus™-u, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 49. Može se uočiti da profili dobijeni GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa odgovaraju profilima dobijenim simulacijama u Simcyp®-u. Gastrointestinalna simulacija u GastroPlus™ programskom paketu takođe je potvrdila značajan uticaj *in vitro* profila brzine rastvaranja na simulirani profil koncentracije nimesulida u plazmi.

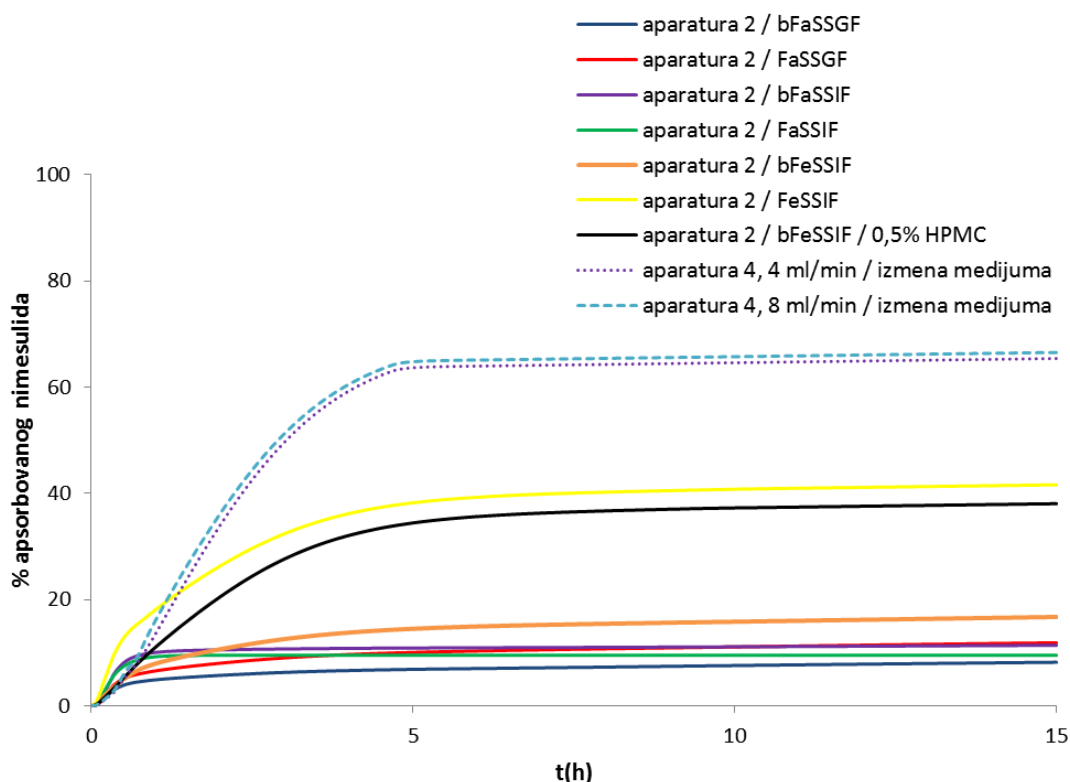
Tabela 49. Farmakokinetički parametri predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja nimesulida iz tableta i odgovarajuće greške predviđanja

<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$ (µg/ml)	%PE	$t_{max}$ (h)	%PE	$PIK_{0-t}$ (µgh/ml)	%PE
Uređaj	Medijum/protok						
Aparatura 2	bFaSSGF	0,33	90,06	1,20	67,39	3,37	85,85
	FaSSGF	0,46	86,14	1,65	55,16	4,69	80,31
	bFaSSIF	0,69	79,21	0,85	76,90	4,22	82,28
	FaSSIF	0,63	81,02	0,85	76,90	3,38	85,81
	bFeSSIF	0,64	80,72	2,65	27,98	6,56	72,46
	FeSSIF	1,69	49,02	3,10	15,76	15,19	36,23
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,56	53,01	3,55	3,53	13,92	41,56
Aparatura 4	4 ml/min	3,00	9,63	3,75	1,90	23,65	0,71
	8 ml/min	3,03	8,73	3,65	0,81	24,05	0,96
<i>In vivo</i> profil		<b>3,32</b>	/	<b>3,68</b>	/	<b>23,82</b>	/

Simulacije su pokazale, kao i kod Simcyp® programskog paketa, da se najveća sličnost između simuliranog i stvarnog profila koncentracije nimesulida u plazmi može uočiti u slučaju kada se kao ulazni profil koristi eksperimentalno određeni profil brzine rastvaranja u aparaturi sa protočnom ćelijom, pri brzini protoka od 8 ml/min, uz izmenu medijuma.

### Identifikacija profila apsorpcije nimesulida primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

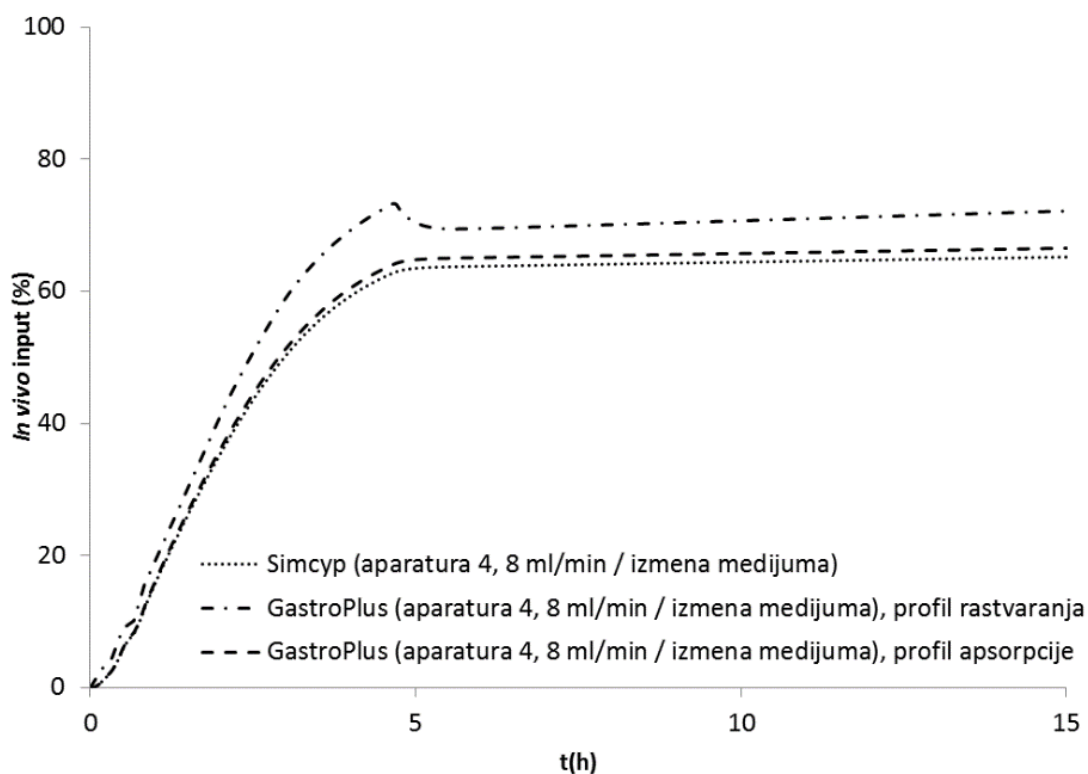
U ovoj fazi ispitana je mogućnost primene GI simulacije u GastroPlus™-u za identifikaciju *in vivo* inputa, koji će se potom koristiti za uporednu analizu sa rezultatima dobijenim gastrointestinalnom simulacijom u Simcyp®-u, kao i za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije.



Slika 71. *In vivo* profili apsorpcije nimesulida dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u GastroPlus™-u za tablete sa trenutnim oslobađanjem

*In vivo* profili apsorpcije nimesulida iz tableta dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u, predstavljeni su na slici 71. Najveći predviđeni obim apsorpcije nimesulida od oko 70% dobijen je u slučaju korišćenja *in vitro* profila brzine rastvaranja dobijenog u aparaturi sa protočnom ćelijom, ali je i ta vrednost manja u odnosu na literaturne podatke o biološkoj raspoloživosti nimesulida iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Singh i sar, 2001). Ako rezultate uporedimo sa rezultatima dobijenim GI simulacijom u Simcyp®-u može se uočiti da oba programska paketa predviđaju isti obim apsorpcije.

Uporedni pregled *in vivo* input profila dobijenih GI simulacijom korišćenjem Simcyp® i GastroPlus™ programskog paketa prikazan je na slici 72 (radi preglednosti prikazani su samo profili dobijeni na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja u aparaturi sa protočnom ćelijom, pri protoku od 8 ml/min i uz korišćenje izmene medijuma).



Slika 72. *In vivo* input profili nimesulida dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u Simcyp® i GastroPlus™ programskom paketu za tablete sa trenutnim oslobađanjem

#### 4.5.6 *In vitro-in vivo* korelacija

##### Dekonvolucioni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili predviđeni Simcyp® i GastroPlus™ gastrointestinalnom simulacijom analizirani su u odnosu na *in vitro* rezultate brzine rastvaranja nimesulida iz tableta dobijene pod različitim eksperimentalnim uslovima.

Tabela 50. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem nimesulida i odgovarajući faktori skaliranja vremenske ose

<i>In vitro</i> profil		$\tau_d$ (h)	$\beta$	TS	
Uređaj	Medijum/protok			Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2	<b>bFaSSGF</b>	0,15	1,61	12,20	12,93
	<b>FaSSGF</b>	0,16	2,50	11,43	12,12
	<b>bFaSSIF</b>	0,18	1,93	10,16	10,77
	<b>FaSSIF</b>	0,15	2,96	12,20	12,93
	<b>bFeSSIF</b>	0,20	0,39	9,15	9,70
	<b>FeSSIF</b>	0,22	0,72	8,31	8,81
	<b>bFeSSIF/0,5% HPMC</b>	13,9	0,76	0,13	0,14
Aparatura 4	<b>4 ml/min</b>	4,03	1,25	0,45	0,48
	<b>8 ml/min</b>	3,25	1,32	0,56	0,60

Tabela 51. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za tablete sa trenutnim oslobađanjem nimesulida (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro input/ in vivo input</i>		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uređaj	Medijum/protok			
Aparatura 2	bFaSSGF	<b>a</b>	18,6030	17,6210
		<b>r</b>	0,9982	0,9984
	FaSSGF	<b>a</b>	13,0120	12,3050
		<b>r</b>	0,9880	0,9934
	bFaSSIF	<b>a</b>	8,3460	7,8862
		<b>r</b>	0,9940	0,9979
	FaSSIF	<b>a</b>	8,7379	8,3505
		<b>r</b>	0,9811	0,9901
	bFeSSIF	<b>a</b>	14,8170	13,6000
		<b>r</b>	0,9624	0,9415
	FeSSIF	<b>a</b>	5,3997	4,9385
		<b>r</b>	0,9766	0,9613
	bFeSSIF/0,5% HPMC	<b>a</b>	0,7169	0,6482
		<b>r</b>	0,8839	0,8693
Aparatura 4	4 ml/min	<b>a</b>	0,7632	0,7063
		<b>r</b>	0,9847	0,9844
	8 ml/min	<b>a</b>	0,8162	0,7435
		<b>r</b>	0,9957	0,9978

**a** – nagib regresione prave; **r** – koeficijent korelacije

S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale TS. Hipotetički input profili dobijeni korišćenjem različitih dekonvolucionih metoda, kao i eksperimentalni profili brzine rastvaranja nimesulida iz tableta fitovani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Vrednosti TS faktora izračunate su kao odnos  $\tau_{d_{vivo}}$  i  $\tau_{d_{vitro}}$  (tabela 50). Može se uočiti da se vrednosti faktora TS značajno razlikuju u zavisnosti od primenjenog profila brzine rastvaranja i kreću se u opsegu 0,13 do 12,93.

Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom za tablete sa trenutnim oslobađanjem nimesulida nakon korekcije vremenske ose prikazani su u tabeli 51. Visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisan vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0,95, dobijen je u svim ispitivanim slučajevima osim kada je *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja rađeno u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje viskoznog medijuma. Međutim, vrednosti nagiba regresione prave koje daleko odstupaju od vrednosti jedan ukazuju da ne postoji zadovoljavajuća korelacija sa *in vivo* podacima. Najbolja korelacija, odnosno vrednosti nagiba regresione prave približno broju jedan, kao i visoka vrednost koeficijenta korelacije dobijena je kada su korišćeni *in vitro* profili brzine rastvaranja dobijeni u aparaturi sa protočnom ćelijom. Dobijeni rezultati potvrđuju da u slučajevima kada rastvaranje i apsorpciju leka nije moguće analizirati primenom konvencionalni farmakokinetičkih metoda, *in silico* modeli se mogu uspešno koristiti za identifikaciju *in vivo* input profila i uspostavljanje korelacije između *in vivo* i *in vitro* podataka.

### Konvolucioni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije, profili koncentracije nimesulida u plazmi predviđeni primenom Simcyp® i GastroPlus™ simulacije analizirani su u

odnosu na srednji farmakokinetički profil uočen u *in vivo* studiji Jovanović i sar. (2005) za tablete sa trenutnim oslobađanjem nimesulida.

Statistički parametri linearne regresione analize za tablete sa trenutnim oslobađanjem nimesulida prikazani su u tabeli 52. Analiza zasnovana na konvolucionom pristupu dala je rezultate vrlo slične rezultatima dobijenim primenom dekonvolucionog pristupa uspostavljanju IVIVK. Iz podataka prikazanih u tabeli 52 vidi se da je primenom konvolucione metode dobijena najbolja korelacija predviđenih i *in vivo* uočenih rezultata korišćenjem oba programska paketa postignuta za profile brzine rastvaranja nimesulida u aparaturi sa protočnom ćelijom uz izmenu medijuma.

Tabela 52. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za tablete sa trenutnim oslobađanjem nimesulida primenom gastrointestinalne simulacije (konvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> profil		Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
Uređaj	Medijum/protok	a	r	a	r
Aparatura 2	bFaSSGF	6,0230	0,6896	6,6347	0,7147
	FaSSGF	4,3269	0,7256	5,3205	0,7933
	bFaSSIF	2,0320	0,5523	2,4661	0,5728
	FaSSIF	2,1235	0,5012	2,3638	0,5089
	bFeSSIF	4,0123	0,9012	4,5726	0,9244
	FeSSIF	1,6598	0,9326	1,8157	0,9483
	bFeSSIF/0,5% HPMC	2,0021	0,9678	2,0339	0,9855
Aparatura 4	4 ml/min	0,9912	0,9423	0,9926	0,9525
	8 ml/min	0,9923	0,9578	0,9941	0,9672

a – nagib regresione prave; r – koeficijent korelacije

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom, bez obzira na upotrebljeni medijum, ukazuju na sporo i nepotpuno rastvaranje nimesulida. Jasan plato u profilima brzine rastvaranja u saglasnosti je sa niskom rastvorljivošću nimesulida pri pH vrednostima ispitivanih medijuma i ukazuje da je niska rastvorljivost ograničavajući faktor za rastvaranje nimesulida iz ispitivanog preparata. U medijumu sa značajnijom koncentracijom fizioloških surfaktanata (FeSSIF) neznatno je povećan obim i brzina rastvaranja nimesulida. U aparaturi sa protočnom ćelijom zabeležena je nešto drugačija kinetika rastvaranja nimesulida u poređenju sa rezultatima dobijenim u aparaturi sa lopaticom. Naime, iako je nakon 60 min postignut isti obim rastvaranja nimesulida iz tableta, jasno se može uočiti da nije postignut plato i može se pretpostaviti da bi konstantan priliv svežeg medijuma rezultovao daljim rastvaranjem nimesulida. Dobijeni rezultati ukazuju na značaj zapremine medijuma koji se koristi u ispitivanju brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitih supstanci, kao i da se potpuno rastvaranje ne može očekivati čak ni u slučaju kada se koriste fiziološki zasnovani medijumi ukoliko se koristi ograničena zapremina medijuma i nisu obezbeđeni *sink* uslovi, kao što je to slučaj u aparaturi sa lopaticom.

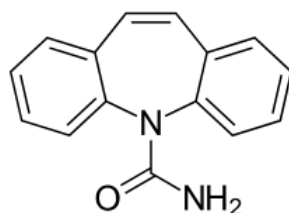
Gastrointestinalnom simulacijom na osnovu odabranih fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina nimesulida kao ulaznih podataka, korišćenjem oba programska paketa dobijeni su profili koncentracije lekovite supstance u plazmi koji se dobro slažu sa *in vivo* uočenim vrednostima. Simulirani profil regionalne apsorpcije nimesulida u saglasnosti je sa *in vivo* dobijenim rezultatima regionalne apsorpcije ukazujući da se nimesulid dominantno apsorbuje u tankom crevu (oko 87%), dok je apsorpcija u kolonu zanemarljiva (5%).

Dobijeni rezultati su pokazali da na rezultate GI simulacije značajno utiče ulazni profil brzine rastvaranja. Najbolje slaganje između simuliranog i stvarnog profila koncentracije nimesulida u plazmi može se uočiti u slučaju kada se kao ulazni profil koristi eksperimentalno određen profil brzine rastvaranja u aparaturi sa protočnom ćelijom, pri brzini protoka od 8 ml/min uz izmenu medijuma. Simulirani profili apsorpcije dobijeni GI simulacijom na osnovu

eksperimentalnih *in vitro* profila brzine rastvaranja predviđaju niži obim apsorpcije od onog koji je zabeležen *in vivo*. Može se pretpostaviti da pri primenjenim eksperimentalnim uslovima ispitivanja brzine rastvaranja tableta sa trenutnim oslobađanjem nimesulida nije postignuta brzina rastvaranja koja bi odgovarala *in vivo* brzini rastvaranja. Grbić (2011) je primenom GI simulacije korišćenjem GastroPlus®-a pokazala da ukoliko je više od 85% nimesulida rastvoreno u periodu od 60 min, postiže se dobro slaganje simuliranih i *in vivo* podataka te se navedeno može predložiti kao klinički relevantna specifikacija za tablete sa trenutnim oslobađanjem nimesulida.

Procenom mogućnosti uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije primenom dekonvolucionog i konvolucionog pristupa analizi podataka došlo se do zaključka da je kod obe metode najbolja korelacija predviđenih i *in vivo* uočenih rezultata postignuta za profile brzine rastvaranja nimesulida u aparaturi sa protočnom ćelijom uz izmenu medijuma.

## 4.6 MODEL SUPSTANCA: KARBAMAZEPIN



5H-dibenzo[b,f]azepin-5-karboksiamid

Slika 73. Strukturna formula i hemijski naziv karbamazepina

Karbamazepin je derivat karboksamida, po strukturi sličan tricikličnim antidepresivima. Koristi se u terapiji parcijalnih napada sa kompleksnom simptomatologijom (psihomotorna i temporalna epilepsija), kod generalizovanih tonično-kloničnih napada (*grand mal*), kod mešovitih oblika epileptičnih napada, kod neuralgija *nervusa trigemina* (paroksizmalni bol), i kao profilaksa manično-depresivne psihoze kod pacijenata koji ne reaguju na terapiju litijumom. Doze karbamazepina se određuju strogo individualno na osnovu procene kliničke efikasnosti i merenja koncentracije leka u plazmi. Uobičajna doza za odrasle je 100 do 400 mg, a maksimalna dnevna doza 1600 mg (u izuzetnim slučajevima 2 g) (Farmakoterapijski vodič, 2022). Detaljan pregled fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i biofarmaceutskih svojstava karbamazepina prikazan je u okviru nedavno objavljene FIP Biowaiver monografije (García i sar, 2021b).

### 4.6.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva karbamazepina

Karbamazepin je slaba baza, i u fiziološkom opsegu pH vrednosti nalazi se u nejonizovanom obliku, s obzirom da pKa vrednost iznosi 11,83 (Kapp, 2004). Particioni koeficijent oktanol/voda iznosi 2,38 (Dollery, 1999). Metodom intestinalne perfuzije dobijena je efektivna permeabilnost kroz humani jejunum od  $4,3 \cdot 10^{-4}$  cm/s (Dollery, 1999), što ukazuje da se radi o visoko permeabilnoj lekovitoj supstanci.

Podatak o rastvorljivosti karbamazepina pokazuje veliku varijabilnost i kreće se u opsegu 0,11 do 0,26 mg/ml što ga svrstava u grupu nisko rastvorljivih lekovitih supstanci. Dodatak fizioloških surfaktanata samo neznatno povećava rastvorljivost karbamazepina (tabela 53).

Tabela 53. Rastvorljivost karbamazepina u fiziološki zasnovanim medijumima u mg/ml (Bhise i Rajkumar, 2008; Grbić, 2011)

Vrsta medijuma	voda	FaSSGF	SGF <sub>sp</sub>	FeSSIF	FaSSIF	SCoF
Rastvorljivost (mg/ml)	0,21	0,22	0,19	0,27	0,26	0,19

SGF<sub>sp</sub> – simulirani želudačni sok bez pepsina (engl. *Simulated Gastric Fluid Without Pepsin*)

Karbamazepin se nakon oralne primene apsorbuje sporo i maksimalne koncentracije u plazmi postižu se nakon 2-24 h (u proseku 6 h), nakon primene pojedinačne doze leka (Bauer, 2008). Lekovita supstanca se skoro u potpunosti apsorbuje iz GIT-a (Bauer, 2008; Chiou i Buehler, 2002; Kapp, 2004;). Prethodno navedeni podaci ukazuju da se karbamazepin može svrstati u klasu 2 BCS.

Vezivanje karbamazepina za proteine plazme iznosi oko 75%, pokazuje značajnu interindividualnu varijabilnost (Bauer, 2008; Kapp, 2004; MacKichan i Zola, 1984). Volumen distribucije iznosi 1-2 L/kg. Oko 30% leka eliminiše se fecesom, dok se ostatak eliminiše urinom. Poluvreme eliminacije nakon primene pojedinačne doze leka iznosi 18-65 h (prosečno 35 h), dok se kod produženog doziranja smanjuje na 10-30 h, usled autoindukcije metabolizma u



jetri. Takođe, kod pojedinačnog doziranja klirens lekovite supstance iznosi 11-26 ml/h/kg, dok se kod produženog doziranja ova vrednost povećava na 50-100 ml/h/kg (Bauer, 2008; Kapp, 2004).

#### 4.6.2 *In vivo* podaci

S obzirom na to da ne postoje podaci o intravenskoj primeni rastvora ove supstance, apsolutna biološka raspoloživost karbamazepina nije poznata, što ograničava primenu nekih konvencionalnih farmakokinetičkih metoda za analizu njegove apsorpcije. U cilju biofarmaceutske karakterizacije korišćen je profil koncentracije karbamazepina u plazmi dobijen nakon oralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem Géradin i sar. (1976). Ovi autori poredili su farmakokinetiku karbamazepina nakon jednokratnog i ponovljenog uzimanja tableta sa trenutnim oslobađanjem. Došli su do zaključka da farmakokinetika karbamazepina odgovara jednodimenzionalnom modelu i da nije dozno-zavisna. Pokazali su da se poluvreme eliminacije značajno skraćuje ponovljenim uzimanjem karbamazepina. Osnovni farmakokinetički parametri dobijeni u ovoj studiji prikazani su u tabeli 54.

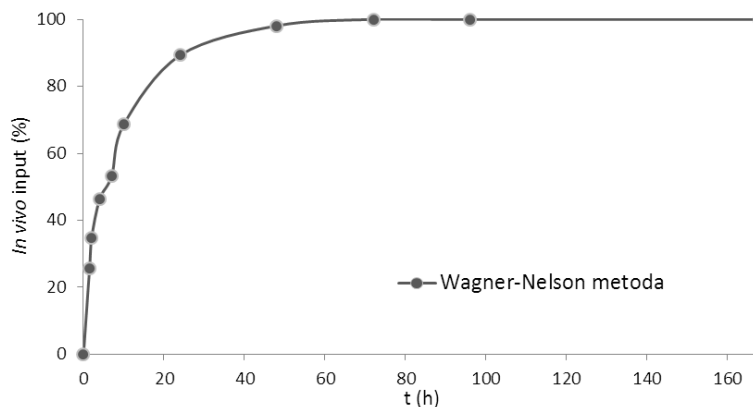
Tabela 54. Osnovni farmakokinetički parametri tableta sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	Referenca
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (100 mg)	71,0	1,01	21,0	7,9	Géradin i sar. (1976)

S obzirom da apsolutna biološka raspoloživost karbamazepina nije poznata, biofarmaceutska karakterizacija i *in vitro* i *in silico* modeli predviđanja apsorpcije karbamazepina od izuzetnog su značaja radi mehanističkog sagledavanja farmakokinetike i individualizacije terapije.

#### 4.6.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila karbamazepina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

Kako u literaturi ne postoje podaci o intravenskoj primeni karbamazepina, a farmakokinetika karbamazepina odgovara jednodimenzionalnom modelu, jedina konvencionalna farmakokinetička metoda koju je bilo moguće primeniti je Wagner-Nelson metoda. *In vivo* input profil dobijen Wagner-Nelson metodom za preparat sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina Géradin i sar. (1976) prikazan je na slici 74. Primenom Wagner-Nelson metode dobijen je hipotetički profil apsorpcije karbamazepina koji ukazuje na veoma sporu apsorpciju karbamazepina, koja se odvija duž čitavog GIT-a.



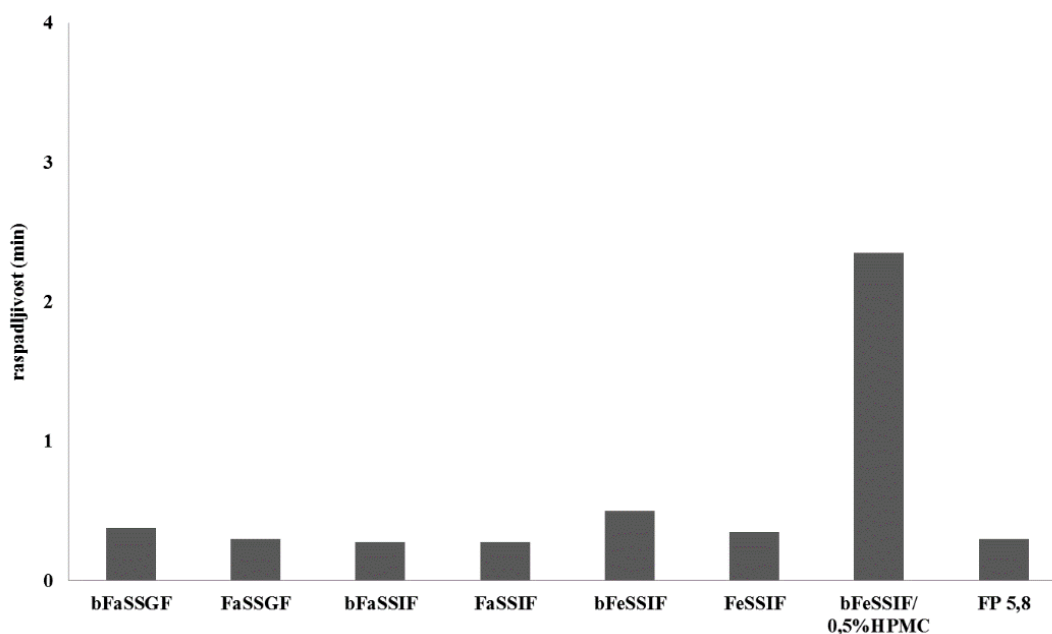
Slika 74. *In vivo* input profil karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Géradin i sar, 1976) primenom Wagner-Nelson metode

#### 4.6.4 *In vitro* ispitivanja

Ispitivanje raspadljivosti sprovedeno je u cilju ispitivanja uticaja različitih medijuma na raspadljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina i njegovog uticaja na brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz komercijalno dostupnog preparata tipa tableta sa trenutnim oslobađanjem sprovedeno je u cilju razmatranja uticaja različitih eksperimentalnih uslova: vrste i sastava medijuma, tipa aparature, kao i hidrodinamičkih uslova na kinetiku rastvaranja karbamazepina. Kao medijumi za ispitivanje korišćeni su: vodeni medijumi različitih pH vrednosti (voda i fosfatni pufer pH 5,8), viskozni medijum (0,5% HPMC u bFeSSIF), kao i fiziološki zasnovani medijumi sa i bez dodatka lecitina i tauroholata. Ispitivanje brzine rastvaranja iz tableta sprovedeno je u aparaturi sa lopaticom (aparatura 2) i aparaturi sa protočnom ćelijom (aparatura 4) uz variranje brzine protoka medijuma.

##### Raspadljivost tableta

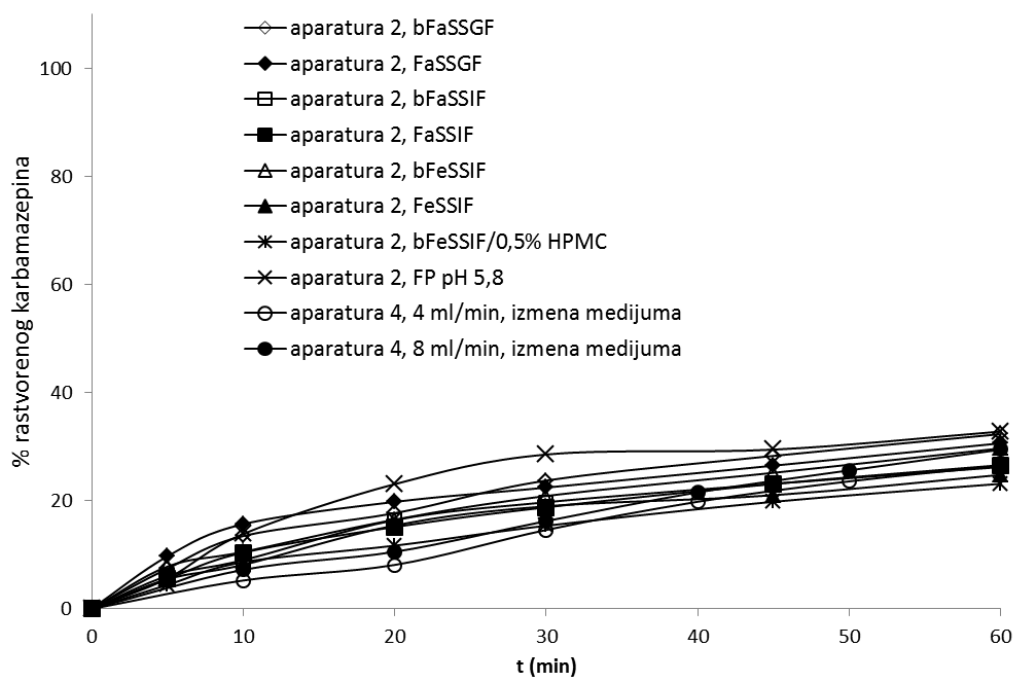
Rezultati ispitivanja raspadljivost tableta u različitim medijumima prikazani su na slici 75. Može se uočiti da se tablete sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina raspadaju veoma brzo i da sastav medijuma ne utiče značajno na raspadljivost tableta (neznatno je produženo u slučaju primene viskoznog medijuma).



Slika 75. Raspadljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina u različitim medijumima

##### Brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta

Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta pod različitim eksperimentalnim uslovima prikazani su na slici 76. Može se uočiti da je nakon 60 min ispitivanja u svim slučajevima rastvoreno oko 25% karbamazepina. Sastav i pH vrednost medijuma, kao i izabrani hidrodinamički uslovi nisu imali značajnog uticaja na *in vitro* brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa niskom i pH-nezavisnom rastvorljivošću karbamazepina, kao i sa neznatnim uticajem fizioloških surfaktanata na rastvorljivost karbamazepina (tabela 53).



Slika 76. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćenjem različitih aparatura i medijuma

#### 4.6.5 *In silico* ispitivanja

U okviru ovog poglavlja biće opisani razvoj i validacija *in silico* modela za simulaciju apsorpcije karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćenjem programskih paketa Simcyp<sup>®</sup> i GastroPlus<sup>™</sup> sa ciljem mehanističke interpretacije apsorpcije karbamazepina, identifikacije bioprediktivne metode i postavljanja klinički relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja.

##### 4.6.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> programskog paketa

Simulacija apsorpcije karbamazepina iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa *Simcyp<sup>®</sup> Population-Based Simulator* (verzija 13.2, Certara<sup>™</sup>, SAD). Profil koncentracije karbamazepina u plazmi simuliran je na osnovu fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 55, čije su vrednosti preuzete iz literature ili su *in silico* predviđene. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. U cilju validacije modela korišćen je srednji profil koncentracije karbamazepina u plazmi iz studije Gérardin i sar. (1976).

Kao apsorpcioni model u svim simulacijama korišćen je ADAM model. Karbamazepin u fiziološkom opsegu pH vrednosti pokazuje pH-nezavisnu rastvorljivost, te je u simulacijama korišćena vrednost rastvorljivosti u vodi iz studije Grbić (2011). Vrednost efektivne permeabilnosti preuzeta je iz studije Dollery (1999). Scintigrafske studije na ljudima ukazuju da se karbamazepin apsorbuje duž celog GI trakta (Wilding i sar, 1991) i da je brzina apsorpcije određena brzinom rastvaranja lekovite supstance. Veličina čestica lekovite supstance prepoznat je kao parametar koji značajno utiče na *in vivo* brzinu rastvaranja karbamazepina i njegovu biološku raspoloživost, pa je *Simcyp<sup>®</sup> Parameter Estimation* opcijom optimizovana njegova vrednost kako bi se dobilo što bolje slaganje predviđenih i *in vivo* rezultata. Korišćena je težinska funkcija *Weighted least square* i Nelder-Mead metoda optimizacije. Volumen

distribucije preuzet je iz studije Rawlins i sar. (1975). Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi, kao i vrednost slobodne frakcije leka u plazmi preuzete su iz Kapp (2004). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

Tabela 55. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije karbamazepina

<b>Parametar (jedinica mere)</b>	<b>Vrednost</b>
Molekulska masa (g/mol)	236,27
logP <sub>o:w</sub>	2,38 <sup>a</sup>
Jednokisela baza	
pKa	11,83 <sup>b</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1,6 <sup>b</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub>	0,25 <sup>b</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, P <sub>eff</sub> (cm/s)	4,3 · 10 <sup>-4</sup> <sup>c</sup>
Rastvorljivost (mg/ml)	0,21 na pH 5,76 <sup>d</sup>
Vreme zadržavanja u kolonu (h)	12 <sup>e</sup>
Konstanta precipitacije (h <sup>-1</sup> )	4 <sup>e</sup>
Radius čestica lekovite supstance (μm)	180 <sup>f</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>e</sup>
Distribucija	
potpuni PBPK model, metoda 2	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, V <sub>ss</sub> (L/kg)	1,14 <sup>g</sup>
Eliminacija	
CL <sub>po</sub> (L/h)	1,3 <sup>h</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	100
Vreme simulacije (h)	168
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250

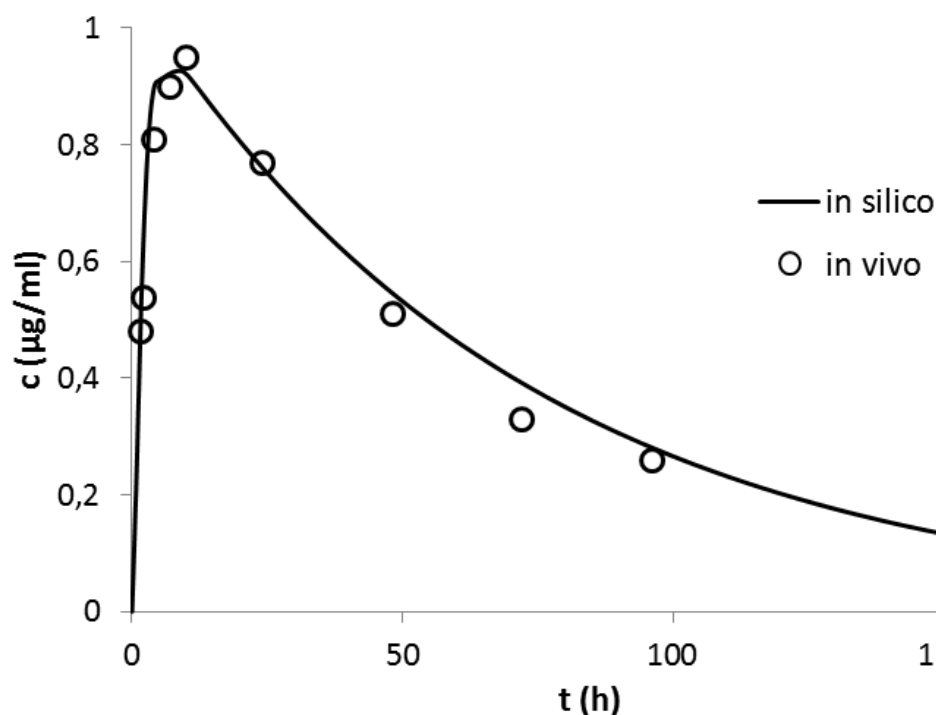
<sup>a</sup>Podatak iz literature (Chen i Yu, 2009); <sup>b</sup> Podatak iz literature (Kapp,2004); <sup>c</sup> Podatak iz literature (Dollery, 1999); <sup>d</sup> Podatak iz literature (Grbić, 2011); <sup>e</sup> Simcyp<sup>®</sup> vrednost; <sup>f</sup> Predviđena vrednost korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> Parameter Estimation opcije; <sup>g</sup> Podatak iz literature (Rawlins i sar, 1975); <sup>h</sup> Podatak iz literature (Walker i Whittlesea, 2012);

Ako parametre koji su korišćeni za razvoj modela uporedimo sa ulaznim parametrima iz studije Kovačević i sar. (2008) može se primetiti da je korišćena značajno veća eksperimentalna vrednost rastvorljivosti ali je zato procenjena veća veličina čestica.

## Razvoj i validacija modela

Simulirani profil koncentracije karbamazepina u plazmi na osnovu ulaznih parametara prikazanih u tabeli 55 u saglasnosti je sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Gérardin i sar. 1976) što je prikazano na slici 77.

Tačnost predviđanja procenjena je izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara (C<sub>max</sub>, t<sub>max</sub> i PIK<sub>0-t</sub>), prikazanih u tabeli 56. S obzirom da su dobijene vrednosti greške predviđanja manje od 10%, model se smatra validiranim i kao takav korišćen je za dalja ispitivanja.



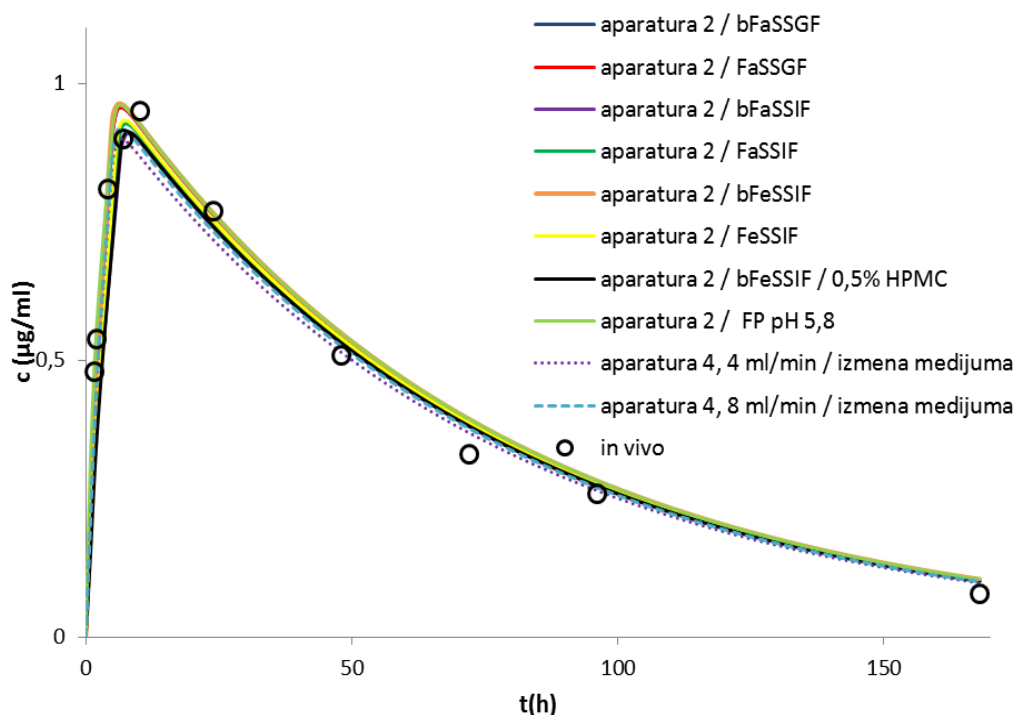
Slika 77. Simulirani profil koncentracije karbamazepina u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na profil uočen *in vivo* literaturi (Géradin i sar. 1976)

Tabela 56. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih greški predviđanja za tablete sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina

Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{max}$ (µg/ml)	0,95	0,93	2,10
$t_{max}$ (h)	9,30	8,40	9,67
$PIK_{0-t}$ (µgh/ml)	69,32	66,98	3,34

### Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Da bi se ispitaio uticaj brzine rastvaranja na profil koncentracije karbamazepina u plazmi, eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije. Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 78. Simulirani profili ukazuju na dobro slaganje sa *in vivo* podacima u slučaju kada je više od 25% lekovite supstance rastvoreno nakon 60 min, što potvrđuju i vrlo slične vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ) koje su prikazane u tabeli 57. Dobijeni rezultati u saglasnosti su odsustvom značajnih razlika u profilima brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta dobijenim pod različitim eksperimentalnim uslovima. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Kovačević i sar. (2008), koji su na osnovu rezultata *in silico* modelovanja predložili postavljanje značajno širih specifikacija *in vitro* brzine rastvaranja karbamazepina nego što je farmakopejski zahtev (USP44-NF39), s obzirom da zbog dugog poluvremena eliminacije koncentracija karbamazepina u plazmi primarno zavisi od poluvremena eliminacije a mnogo manje od profila brzine rastvaranja/apsorpcije.



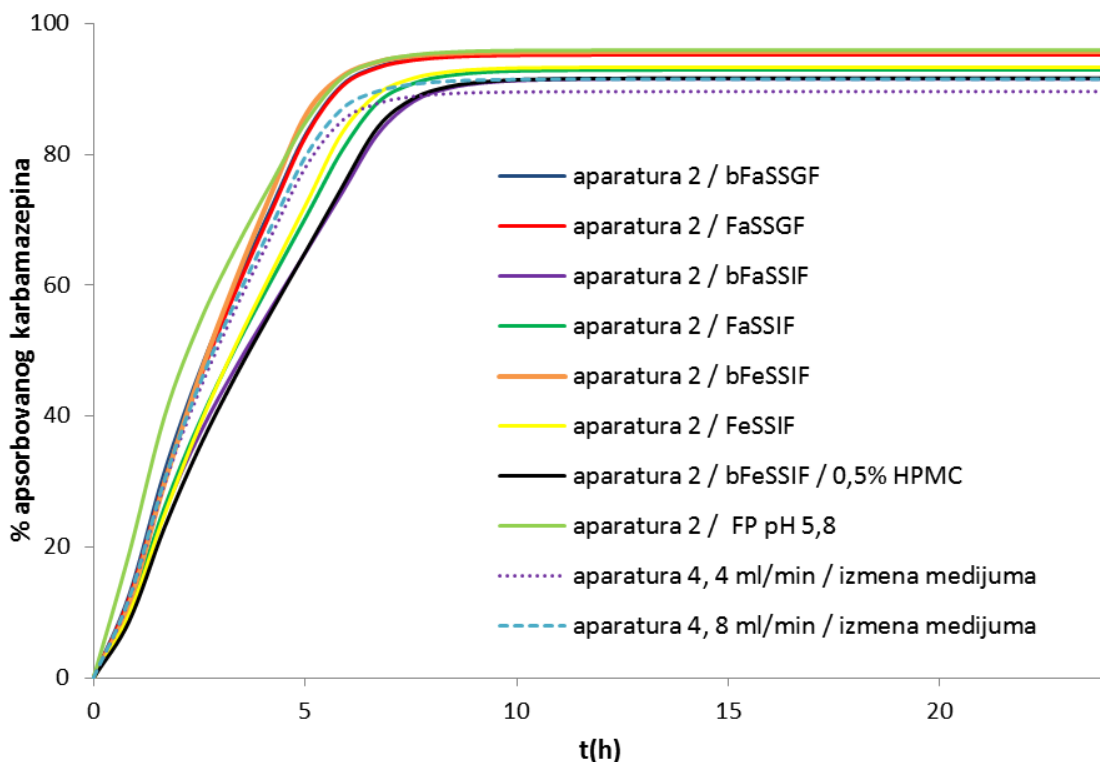
Slika 78. Simulirani profili koncentracije karbamazepina u plazmi na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem zajedno sa *in vivo* uočenim profilom (Gérardin i sar, 1976)

Tabela 57. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta i odgovarajuće greške predviđanja

<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
Aparatura 2	bFaSSGF	0,95	0,00	6,72	27,74	66,7	3,75
	FaSSGF	0,95	0,00	6,72	27,74	66,6	3,89
	bFaSSIF	0,91	4,21	8,40	9,67	64,0	7,64
	FaSSIF	0,92	3,15	7,56	18,70	64,9	6,34
	bFeSSIF	0,96	1,05	6,72	27,74	66,9	3,46
	FeSSIF	0,93	2,10	7,56	18,70	65,2	5,91
	bFeSSIF/0,5% HPMC	0,91	4,21	8,40	9,67	64,0	7,64
	FP 5,8	0,96	1,05	6,72	27,74	67,1	3,17
Aparatura 4	4 ml/min	0,89	6,31	8,40	9,67	62,3	10,09
	8 ml/min	0,90	5,26	7,59	18,38	63,9	7,78
<i>In vivo</i> profil		<b>0,95</b>	/	<b>9,30</b>	/	<b>69,32</b>	/

### Identifikacija profila apsorpcije karbamazepina primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija procesa apsorpcije karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem sprovedena je korišćenjem validiranog modela gastrointestinalne simulacije. Cilj ovih ispitivanja bio je da se proceni mogućnost primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila i uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i gastrointestinalnom simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa.



Slika 79. Hipotetički profili apsorpcije karbamazepina na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja iz tableta sa trenutnim oslobađanjem

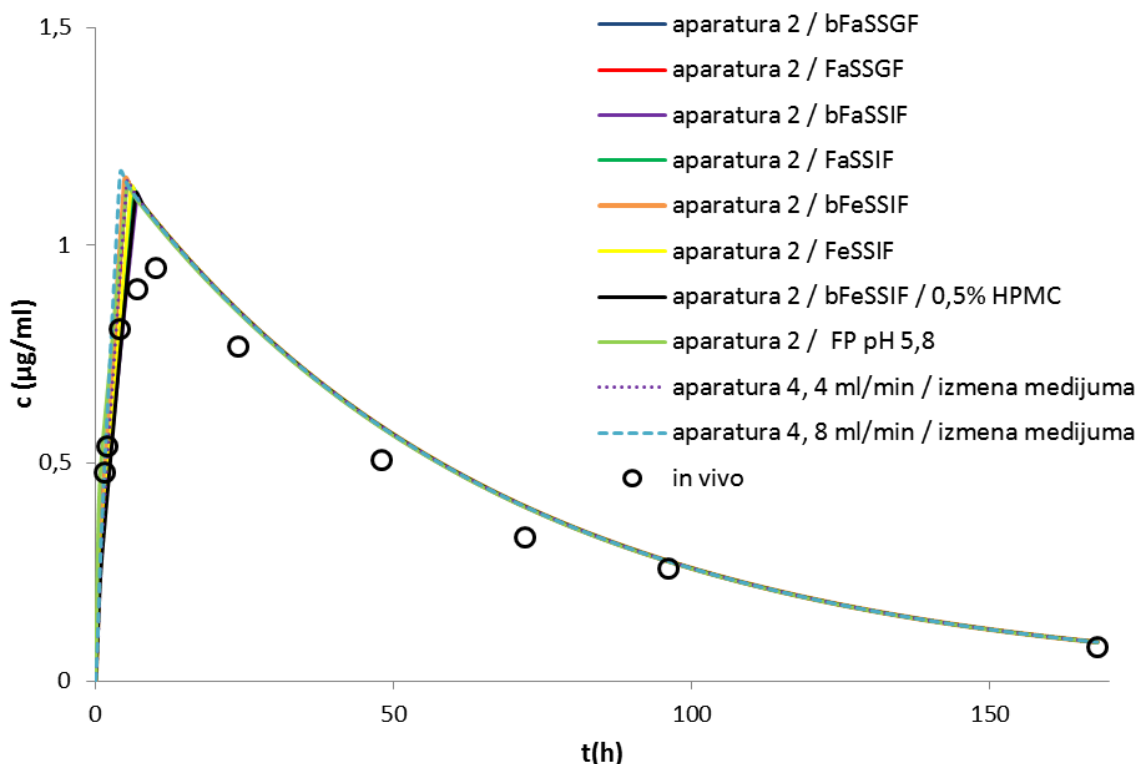
Hipotetički profili apsorpcije karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 79. Može se uočiti da je u svim ispitivanim slučajevima *in silico* predviđen obim apsorpcije viši od 90%, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o gotovo potpunoj apsorpciji karbamazepina iz GIT-a (Bauer, 2008; Kapp, 2004; Chiou i Buehler, 2002).

#### 4.6.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja vrednosti ulaznih parametara prikazane u tabeli 55 korišćene su u okviru komercijalno dostupnog GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) programskog paketa. Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija, izuzev veličine čestica koja je, kao i kod Simcyp® programskog paketa, optimizovana. Dobijena je vrednost od 185 μm što odgovara vrednosti predviđenoj u Simcyp®-u. Vrednosti ASF faktora su optimizovane tako da simulirani profil što manje odstupa od *in vivo* uočenih vrednosti.

Simulirani profili koncentracije karbamazepina u plazmi dobijeni GastroPlus™ gastrointestinalnom simulacijom na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja pod različitim eksperimentalnim uslovima prikazani su na slici 80, dok su odgovarajuće vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ) date u tabeli 58. U poređenju sa rezultatima dobijenim Simcyp® simulacijom, predviđene su nešto više vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ , dok je vreme postizanja maksimalne koncentracije karbamazepina u plazmi nešto kraće. Ovakvi rezultati mogli bi se pripisati razlikama koje postoje između ACAT modela (u okviru GastroPlus™ programskog paketa) i ADAM modela (u okviru Simcyp®-a). Naime, ova dva modela razlikuju se u vrednostima zapremine sadržaja, vremenima zadržavanja, pH vrednostima, kao i koncentracijama žučnih soli u pojedinim delovima GIT-a (tabela 35). Još jedna važna karakteristika ACAT modela (i razlika u odnosu na ADAM model) je sposobnost

izračunavanja konstante brzine apsorpcije leka ( $K_a$ ) u skladu sa regionalnom promenom permeabilnosti leka kroz membranu i ASF faktora specifičnog za svaki segment u okviru modela.



Slika 80. Profili koncentracije karbamazepina u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta i profil uočen *in vivo* (Géradin i sar. 1976)

Tabela 58. Farmakokinetički parametri predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta i odgovarajuće greške predviđanja

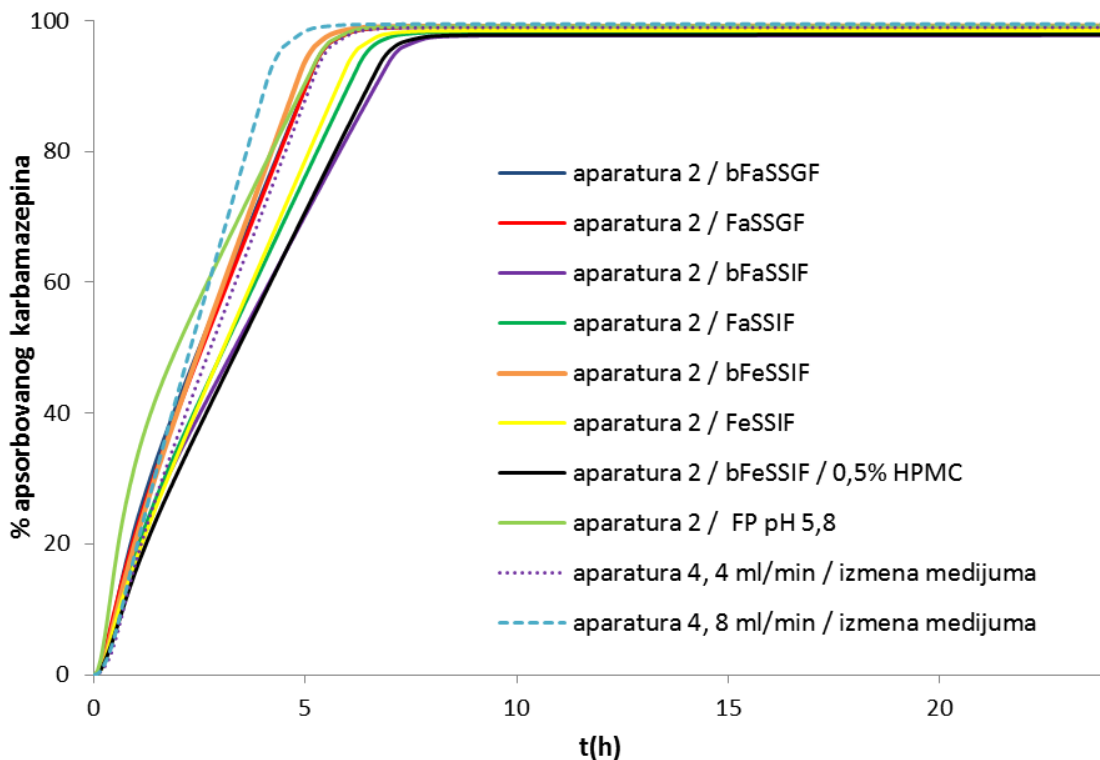
<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$ (µg/ml)	%PE	$t_{max}$ (h)	%PE	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml)	%PE
Uređaj	Medijum/protok						
Aparatura 2	bFaSSGF	1,14	20,00	5,44	41,50	76,26	10,01
	FaSSGF	1,14	20,00	5,38	42,15	76,25	9,99
	bFaSSIF	1,11	16,84	7,12	23,44	75,24	8,54
	FaSSIF	1,13	18,94	6,46	30,53	75,68	9,17
	bFeSSIF	1,15	21,05	5,14	44,73	76,35	10,14
	FeSSIF	1,13	18,94	6,16	33,76	75,82	9,37
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,12	17,89	6,92	25,59	75,32	8,65
	FP pH 5,8	1,14	20,00	5,48	41,07	76,33	10,11
Aparatura 4	4 ml/min	1,15	21,05	5,48	41,07	76,18	9,89
	8 ml/min	1,17	23,15	4,32	53,54	76,58	10,47
<i>In vivo</i> profil		<b>0,95</b>	/	<b>9,30</b>	/	<b>69,32</b>	/

### Identifikacija profila apsorpcije karbamazepina primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

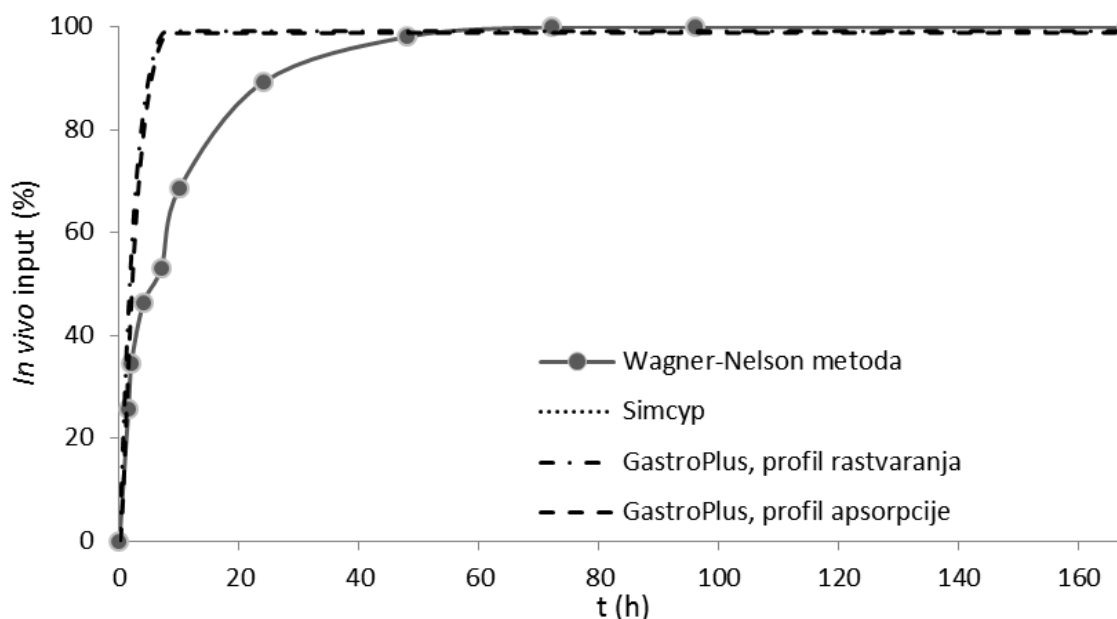
U ovoj fazi ispitana je mogućnost primene gastrointestinalne simulacije u GastroPlus™-u za identifikaciju *in vivo* inputa, koji će se potom koristiti za uporednu analizu sa rezultatima



dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i gastrointestinalnom simulacijom u Simcyp<sup>®</sup>-u, kao i za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije. Hipotetički profili apsorpcije karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u GastroPlus<sup>™</sup>-u, predstavljeni su na slici 81. Predviđeni obim apsorpcije od oko 100% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.



Slika 81. Hipotetički profili apsorpcije karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni GastroPlus<sup>™</sup> gastrointestinalnom simulacijom



Slika 82. *In vivo* input profili karbamazepina dobijeni različitim metodama dekonvolucije

U poređni pregled *in vivo* input profila dobijenih različitim metodama dekonvolucije prikazan je na slici 82. Profili apsorpcije karbamazepina dobijeni GI simulacijom u Simcyp®-u i GastroPlus™-u, ukazuju na značajno bržu apsorpciju u poređenju sa rezultatima dobijenim primenom Wagner-Nelson metode, dok je u svim slučajevima predviđena potpuna apsorpcija karbamazepina. Profili rastvaranja i apsorpcije dobijeni u GastroPlus™-u u saglasnosti su sa visokom permeabilnošću karbamazepina. Na slici 82 su radi preglednosti prikazani samo profili dobijeni na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FaSSIF-a kao medijuma.

#### 4.6.6 *In vitro-in vivo* korelacija

##### Dekonvolucioni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati konvencionalnom farmakokinetičkom analizom (Wagner-Nelson) i profili predviđeni GI simulacijom analizirani su u odnosu na *in vitro* rezultate brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta dobijene pod različitim eksperimentalnim uslovima. S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale, TS. Hipotetički input profili dobijeni korišćenjem konvencionalne farmakokinetičke analize, kao i eksperimentalni profili brzine rastvaranja analizirani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Faktori skaliranja vremenske ose izračunati su kao odnos  $\tau_{d\text{vivo}}$  i  $\tau_{d\text{vitro}}$  (tabela 59). Može se uočiti da se vrednosti TS značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene metode dekonvolucije i *in vitro* profila brzine rastvaranja i kreću se u opsegu 0,48 do 33,66.

Tabela 59. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja i odgovarajući faktori skaliranja vremenske ose

<i>In vitro</i> profil		$\tau_a$ (h)	$\beta$	TS		
Uređaj	Medijum/ protok			Wagner-Nelson metoda	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2	bFaSSGF	1,10	0,70	8,26	2,45	2,59
	FaSSGF	3,84	0,48	2,36	0,70	0,74
	bFaSSIF	0,46	0,90	19,76	5,86	6,19
	FaSSIF	0,85	0,76	10,69	3,17	3,35
	bFeSSIF	5,58	0,60	1,62	0,48	0,51
	FeSSIF	0,43	0,94	21,13	6,27	6,62
	bFeSSIF/0,5% HPMC	4,00	0,68	2,27	0,67	0,71
	FP pH 5,8	0,27	1,27	33,66	10,00	10,55
Aparatura 4	4 ml/min	0,88	1,31	10,32	3,06	3,23
	8 ml/min	3,03	0,95	3,00	0,89	0,94

Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije dobijeni linearnom regresionom analizom podataka nakon korekcije vremenske ose prikazani su u tabeli 60. Nešto bolja korelacija između *in vitro* i *in vivo* podataka, opisana vrednostima koeficijenta korelacije većim od 0,95, dobijena je za profile dobijene GI simulacijom korišćenjem Simcyp® programskog paketa.

Tabela 60. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> input/ <i>in vivo</i> input		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Wagner- Nelson metoda	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uređaj	Medijum/protok				
Aparatura 2	bFaSSGF	<b>a</b>	0,8301	0,8415	0,8680
		<b>r</b>	0,9493	0,9552	0,9191
	FaSSGF	<b>a</b>	0,9272	1,0081	1,0360
		<b>r</b>	0,9851	0,9598	0,9652
	bFaSSIF	<b>a</b>	0,9131	0,6557	0,6911
		<b>r</b>	0,8324	0,9809	0,7738
	FaSSIF	<b>a</b>	0,7935	0,7468	0,7763
		<b>r</b>	0,9027	0,9693	0,8545
	bFeSSIF	<b>a</b>	0,8921	1,0037	1,0491
		<b>r</b>	0,9340	0,9811	0,8898
	FeSSIF	<b>a</b>	0,8751	0,6430	0,6699
		<b>r</b>	0,8272	0,9632	0,7532
	bFeSSIF/0,5% HPMC	<b>a</b>	0,8883	0,9710	1,0477
		<b>r</b>	0,9896	0,9651	0,9741
FP 5,8	<b>a</b>	1,1155	0,6048	0,6168	
	<b>r</b>	0,8517	0,9195	0,7122	
Aparatura 4	4 ml/min	<b>a</b>	0,7555	0,5098	0,7838
		<b>r</b>	0,9151	0,9009	0,8711
	8 ml/min	<b>a</b>	0,8764	0,5290	1,0431
		<b>r</b>	0,9811	0,9192	0,9902

**a** – nagib regresione prave; **r** – koeficijent korelacije

### Konvolucioni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije, profili koncentracije karbamazepina u plazmi predviđeni primenom gastrointestinalne simulacije analizirani su u odnosu na srednji farmakokinetički profil uočen u *in vivo* studiji Gérardin i sar. (1976) za tablete sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina.

Tabela 61. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina primenom gastrointestinalne simulacije (konvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> profil		Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
Uređaj	Medijum/protok	<b>a</b>	<b>r</b>	<b>a</b>	<b>r</b>
Aparatura 2	bFaSSGF	1,0040	0,9900	0,8530	0,9944
		1,0242	0,9897	0,8502	0,9925
	FaSSGF	1,0331	0,9594	0,8583	0,9692
		1,0180	0,9623	0,8515	0,9770
	bFaSSIF	1,0180	0,9623	0,8515	0,9770
		0,9767	0,9798	0,8464	0,9920
	FaSSIF	0,9767	0,9798	0,8464	0,9920
		1,0119	0,9615	0,8518	0,9762
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,0119	0,9615	0,8518	0,9762
1,0024		0,9522	0,8384	0,9628	
Aparatura 4	FP 5,8	1,0010	0,9941	0,8585	0,9967
		1,0010	0,9941	0,8585	0,9967
	4 ml/min	1,0641	0,9874	0,8461	0,9862
	8 ml/min	1,0501	0,9911	0,7947	0,9841

**a** – nagib regresione prave; **r** – koeficijent korelacije

Statistički parametri linearne regresione analize prikazani su u tabeli 61. Iz prikazanih podataka jasno se uočava da se rezultati konvolucionog pristupa u saglasnosti sa rezultatima dekonvolucionog pristupa, odnosno da se nešto bolja korelacija između *in vitro* i *in vivo*

podataka dobijena kada su *in vitro* profili brzine rastvaranja poređeni sa *in vivo* profilom dobijenim GI simulacijom korišćenjem Simcyp<sup>®</sup> programskog paketa.

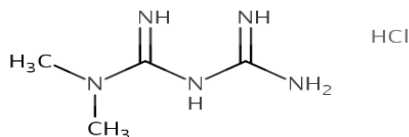
Dobijeni rezultati potvrđuju da se pored konvencionalne farmakokinetičke analize razvijeni *in silico* modeli mogu uspešno koristiti za identifikaciju *in vivo* input profila karbamazepina, koji bi se potom koristili u ispitivanju IVIVK.

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja pod različitim eksperimentalnim uslovima pokazali su da sastav i pH vrednost ispitivanih medijuma, kao i izabrani hidrodinamički uslovi, nemaju značajnog uticaja na brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem, te je u svim ispitivanim eksperimentalnim postavkama postignuto oko 25% rastvorenog karbamazepina nakon 60 min ispitivanja. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa niskom i pH-nezavisnom rastvorljivošću karbamazepina, kao i sa neznatnim uticajem dodatka fizioloških surfaktanata na rastvorljivost karbamazepina.

Gastrointestinalnom simulacijom korišćenjem oba softverska paketa na osnovu razvijenog karbamazepin-specifičnog modela apsorpcije uspešno je predviđen profil koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon oralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem. Veličina čestica karbamazepina je kao i kod nimesulida prepoznata kao kritični parametar koji može uticati na biološku raspoloživost, te je optimizacijom njegove vrednosti postignuto odlično slaganje predviđenih i *in vivo* uočenih farmakokinetičkih profila. Rezultati simulacija su pokazali da ukoliko se koristi *in vitro* profil brzine rastvaranja u kome je nakon 60 min rastvoreno oko 25% lekovite supstance postiže se dobro slaganje simuliranih i *in vivo* podataka te se navedeno može predložiti kao klinički relevantna specifikacija za tablete sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina.

Prilikom procene mogućnosti uspostavljanja korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka primenjeni su dekonvolucioni i konvolucioni pristup analizi podataka, koji su dali vrlo slične rezultate. Obe metode potvrdile su da se visok nivo korelacije može postići kada su *in vitro* profili brzine rastvaranja upoređeni sa profilima dobijenim GI simulacijom korišćenjem oba softverska paketa.

## 4.7 MODEL SUPSTANCA: METFORMIN-HIDROHLORID



1,1-dimetil bigvanidin hidrohlorid

Slika 83. Strukturna formula i hemijski naziv metformin-hidrohlorida

Metformin-hidrohlorid je oralni antihiperглиkemijski lek sa dugom tradicijom primene u tretmanu insulin-nezavisnog dijabetes melitusa, kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugim oralnim antidijabeticima ili insulinom. Uobičajna početna doza je 500 do 850 mg jednom dnevno, koja se uzima tokom ili posle obroka. Maksimalna preporučena doza metformin-hidrohlorida je 2 g dnevno, podeljena u 2 ili 3 pojedinačne doze (Farmakoterapijski vodič, 2022). U Republici Srbiji, metformin je dostupan u obliku film tableta, gastrozistentnih tableta i tableta sa produženim oslobađanjem različitih proizvođača (ALIMS, 2022).

### 4.7.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva metformina

Metformin-hidrohlorid se lako rastvara u vodi i to u odnosu 1:2 (Bertnall i Clarke, 1998). pKa vrednosti metformina iznose 2,8 i 11,5 tako da je duž čitavog GIT-a prisutan uglavnom u jonizovanom obliku (Jack, 1992). Log P vrednost između oktanol i vode iznosi -1,43 (Craig, 1990) što ukazuje na nisku lipofilnost. Nakon oralne primene tableta, maksimalna koncentracija metformin u plazmi ( $C_{max}$ ) dostiže se za 2-3 h ( $t_{max}$ ). Apsolutna biološka raspoloživost tableta sa trenutnim oslobađanjem metformin-hidrohlorida od 500 ili 850 mg je oko 65-80% kod zdravih ispitanika (Tucker i sar, 1981). Posle oralne doze neapsorbovana frakcija izlučena fecesom iznosi oko 20-35%. (Tucker i sar, 1981). Apsorpcija metformina je dozno-zavisna i nepotpuna. Pretpostavlja se da farmakokinetika apsorpcije metformina nije linearna. Pokazano je da je apsolutna biološka raspoloživost nakon primene doze od 850 mg za 14% niža u poređenju sa dozom od 500 mg (Tucker i sar, 1981; Noel, 1979; Sambol i sar. 1996). Hrana smanjuje stepen i blago usporava apsorpciju metformina (Farmakoterapijski vodič, 2022). Vidon i sar. (1988) ispitivali su regionalnu apsorpciju metformina duž GIT-a, i ustanovili da primena metformina nema uticaja na vreme pražnjenja želuca i da se lek neznatno apsorbuje kroz mukozu želuca. Studija je pokazala da se oko 20% leka apsorbuje u duodenumu, oko 60 % u jejunumu i ileumu, dok se 20% izluči nepromenjeno u fecesu. Ispitivanje intestinalne perfuzije kod pacova ukazuje da je efektivna permeabilnost metformina u jejunumu i ileumu značajno niža u poređenju sa duodenumom, pri istim koncentracijama leka. Takođe, efektivna permeabilnost pri visokim koncentracijama leka je značajno je niža u poređenju sa niskim i srednjim vrednostima (Song i sar. 2006). Vezivanje za proteine plazme je zanemarljivo. Srednji volumen distribucije ( $V_d$ ) se kreće između 63 – 276 L (Tucker i sar, 1981). Metformin se izlučuje urinom u nepromenjenom obliku. Kod ljudi nisu identifikovani metaboliti. Renalni klirens metformina je  $>400$  mL/min, što ukazuje na to da se eliminiše glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom. Nakon oralne primene poluvreme eliminacije je oko 6,5 h.

Zbog visoke rastvorljivosti i niske permeabilnosti u GIT-u (Balimane i sar, 2006; Bertnall i Clarke, 1998; Song i sar, 2006) metformin se svrstava u klasu 3 BCS.

#### 4.7.2 *In vivo* podaci

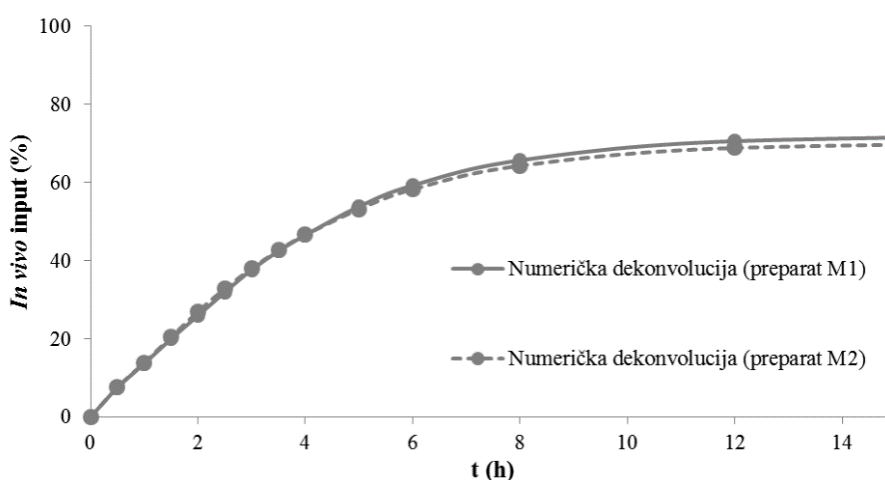
Nakon opsežnog pretraživanja *in vivo* studija dostupnih u literaturi, u cilju biofarmaceutske karakterizacije metformina izabrani su profili koncentracije leka u plazmi za referentni (preparat M1) i generički (preparat M2) preparat za koje je u okviru kliničke studije detaljnije opisane u Homšek i sar. (2010) pokazano da su biološki ekvivalentni, kao i profil koncentracije leka u plazmi nakon intravenske primene 250 mg metformin-hidrohlorida (Tucker i sar, 1981). Osnovni farmakokinetički parametri uočeni nakon primene izabranih farmaceutskih oblika metformin-hidrohlorida prikazani su u tabeli 62.

Tabela 62. Farmakokinetički parametri različitih preparata metformin-hidrohlorida

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	Referenca
i.v. bolus injekcija (250 mg)	5,90	12,51	4,5	/	Tucker i sar, 1981.
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (850 mg, preparat M1)	21,41	3,40	3,50	2,27	Homšek i sar, 2010.
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (850 mg, preparat M2)	21,81	3,38	3,59	2,40	Homšek i sar, 2010.

#### 4.7.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila metformina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

U cilju dobijanja profila apsorpcije metformina *in vivo* primenjena je numerička dekonvolucija u odnosu na profil dobijen nakon intravenske primene, upotrebom softverskog paketa Kinetica 5.0 i *in vivo* profila koncentracija metformina u plazmi nakon primene analiziranih preparata. *In vivo* input profili dobijeni numeričkom dekonvolucijom na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene kao težinske funkcije prikazani su na slici 84. Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da postoji slaganje između input profila, što je i očekivano s obzirom da su ispitivani preparati biološki ekvivalentni. Oba profila ukazuju na nepotpunu apsorpciju metformina (apsorbovano je oko 70% nakon 12 h) što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o njegovoj biološkoj raspoloživosti (Tucker i sar, 1981).



Slika 84. *In vivo* input profili metformina iz film tableta (preparati M1 i M2) dobijeni numeričkom dekonvolucijom

#### 4.7.4 *In vitro* ispitivanja

*In vitro* ispitivanja obuhvatila su dva preparata tipa film tableta sa trenutnim oslobađanjem metformin-hidrohlorida, za koja je prethodno pokazano da su biološki ekvivalentni (Homšek i sar, 2010).

##### Raspadljivost tableta

Ispitivanje raspadljivosti tableta sprovedeno je uz primenu različitih medijuma. Iako je tokom ispitivanja brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida iz tableta primećeno da se preparat M1 uglavnom ne raspada, dok se preparat M2 raspada relativno brzo, u uređaju za ispitivanje raspadljivosti nije uočena značajna razlika između ispitivanih preparata i nije zabeležen značajan uticaj vrste medijuma kada se radi o različitim neviskoznim medijumima. Nešto duže vreme raspadanje, oko 20 minuta, uočeno je u viskoznom medijumu za oba ispitivana preparata.

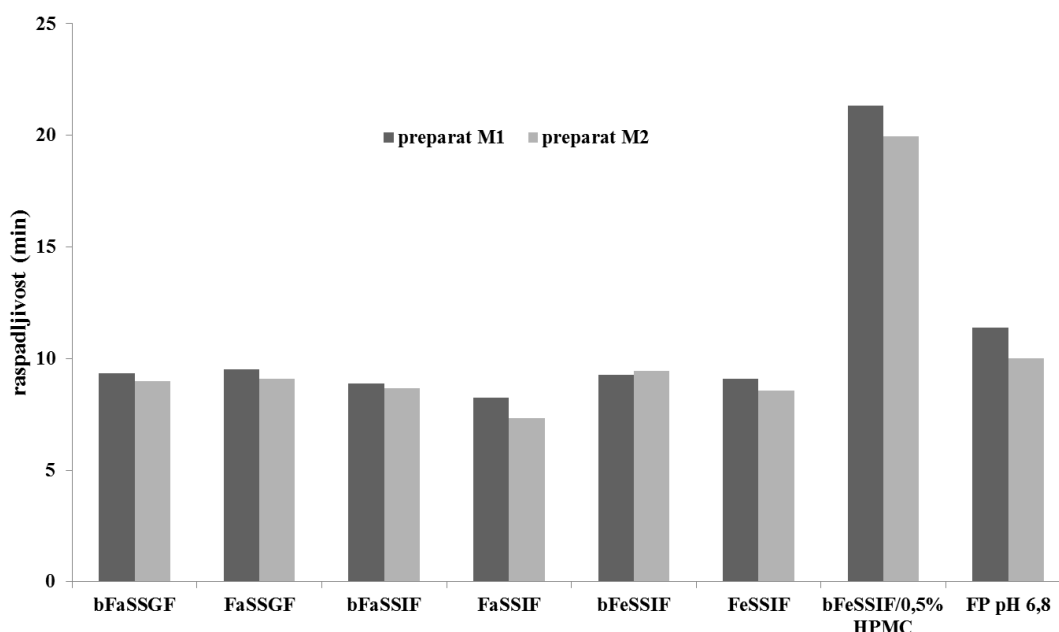
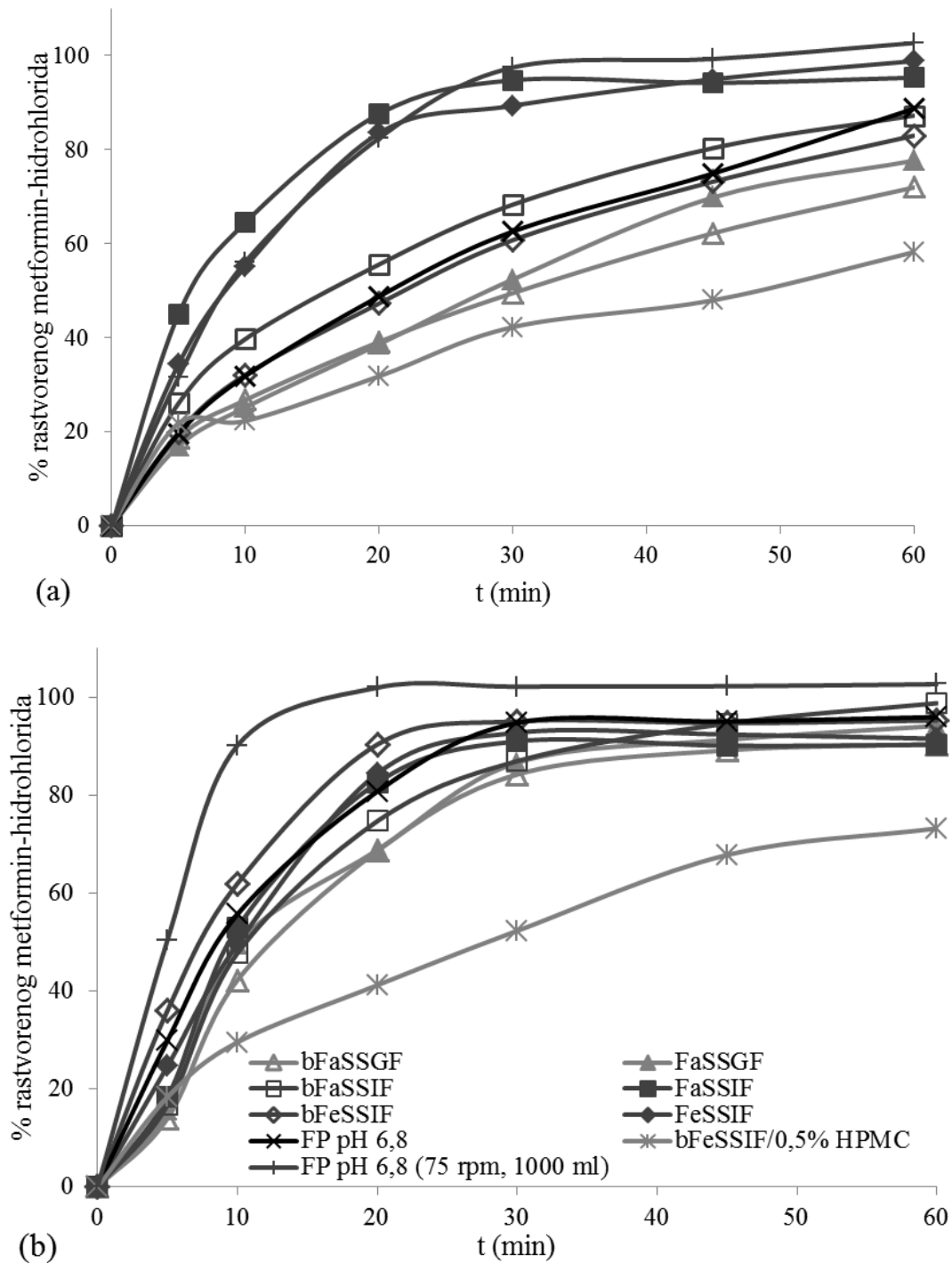


Tabela 63. Raspadljivost tableta metformin-hidrohlorida u različitim medijumima (preparati M1 i M2)

##### Brzina rastvaranja metformin-hidrohlorida iz tableta

Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida iz film tableta u aparaturi sa lopaticom u različitim medijumima prikazani su na slici 85a za preparat M1, odnosno 85b za preparat M2, dok su profili dobijeni korišćenjem dinamičkih uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja (aparatura sa protočnom ćelijom i aparatura sa staklenim kuglicama) prikazani na slici 86a za preparat M1, odnosno 86b za preparat M2. Radi poređenja profila brzine rastvaranja dobijenih pri istim eksperimentalnim uslovima za ispitivane preparate sa dokazanom bioekvivalentnošću izračunati su faktori sličnosti ( $f_2$ ) u skladu sa EMA (2020). U slučajevima kada dobijena vrednost prelazi 50% profili se mogu smatrati sličnim.

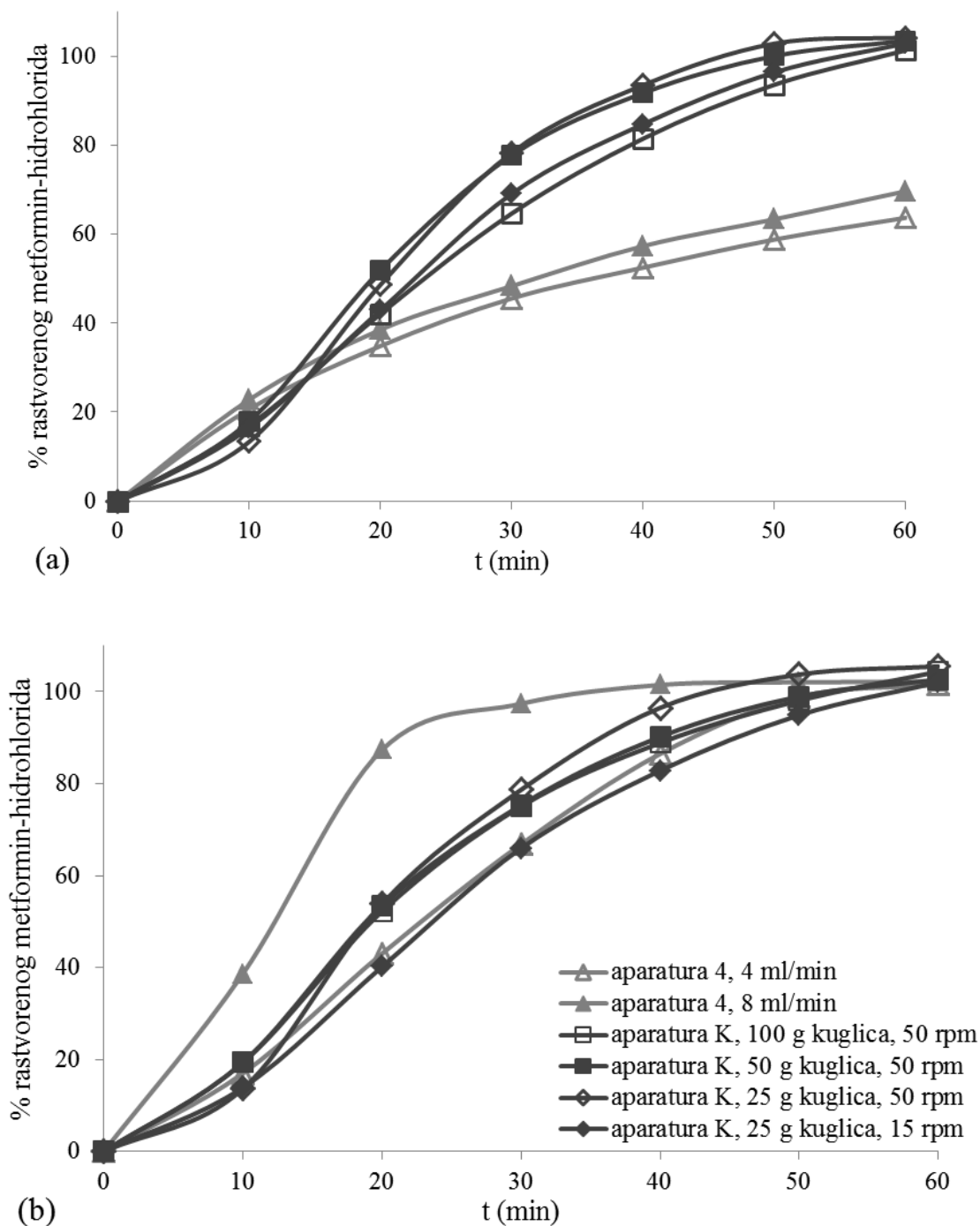


Slika 85. Profili brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida u aparaturi sa rotirajućom lopaticom korišćenjem različitih medijuma za ispitivanje za: preparat M1 (a) i preparat M2 (b)

Može se uočiti da je u slučaju preparata M2 brzina rastvaranja metformin-hidrohlorida iz nešto brža, kao i da je uticaj medijuma manje izražen nego u slučaju preparata M1. U slučaju preparata M1 nešto brže rastvaranje uočeno je korišćenjem FaSSIF i FeSSIF medijuma u poređenju sa medijumima koji ne sadrže žučne soli i lecitin. Jedan od predloženih mehanizama koji se koristi za objašnjenje efekta hrane na brzinu rastvaranja je uticaj povišenog intraluminalnog viskoziteta. U cilju ispitivanja uticaja povišenog intraluminalnog viskoziteta na brzinu rastvaranja metformin-hidrohlorida iz ispitivanih preparata korišćen je bFeSSIF sa



dotakom 0,5% HPMC kao medijum. U ovom medijumu uočeno je nešto sporije rastvaranje metformin-hidroklorida iz oba ispitivana preparata.



Slika 86. Profili brzine rastvaranja metformin-hidroklorida iz tableta korišćenjem dinamičkih uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja (aparatura sa protočnom ćelijom i aparatura sa staklenim kuglicama) za: preparat M1 (a) i preparat M2 (b)

U drugom setu eksperimenata, brzina rastvaranja ispitivana je u aparaturi sa protočnom ćelijom korišćenjem izmene medijuma (15 min bFaSSGF/ 45 min bFaSSIF) pri različitim brzinama protoka medijuma. U slučaju preparata M1, rastvaranje metformina je relativno sporo i na njega nije uticala razlika u brzini protoka medijuma. Rastvaranje lekovite supstance iz

preparata M2 bilo je znatno brže i brzina protoka medijuma pokazala je značajan uticaj, što je dovelo do više od 80% rastvorenog metformin-hidrohlorida nakon 20 min ispitivanja, pri brzini protoka od 8 ml/min. Faktori sličnosti profila brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida iz ispitivanih preparata su 27,5 i 19,9 za brzine protoka 4 ml/min i 8 ml/min, redom.

U trećem setu eksperimenata korišćena je aparatura sa staklenim kuglicama pri različitim eksperimentalnim postavkama. Može se uočiti da povećanje količine staklenih kuglica, pri konstantnoj brzini rotacije (50 rpm), dovodi do blagog smanjenja brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta. U slučaju oba ispitivana preparata uočeno je nešto sporije rastvaranje metformina pri nižoj brzini rotacije.  $f_2$  vrednosti profila brzine rastvaranje metformin-hidrohlorida za preparate M1 i M2 iznose 78,3, 87,0, 57,3 za eksperimentalne postavke sa 25 g, 50 g i 100 g kuglica pri brzini rotacije 50 rpm, respektivno. Izračunata vrednost  $f_2$  iznosi 80,3 u slučaju kada je korišćeno 25 g staklenih kuglica pri brzini rotacije od 15 rpm.

Iako nije bilo izraženih razlika u raspadljivosti ispitivanih preparata prilikom ispitivanja u uređaju za ispitivanje raspadljivosti, razlike u formulacijama ispoljile su se u pogledu različitih brzina rastvaranja lekovite supstance, pri čemu je generički proizvod pokazao „veoma brzo rastvaranje“ (više od 85% leka rastvoreno za manje od 15 min) pri eksperimentalnim uslovima gde je korišćena aparatura sa lopaticom, pri brzini rotacije 75 rpm i uz upotrebu 1000 ml fosfatnog pufera pH vrednosti 6,8.

Brzina rastvaranja metformin-hidrohlorida je, generalno, veća u slučaju generičkog preparata koji sadrži kroskarmelozu-natrijum kao superdezintegrator. U aparaturi sa lopaticom, uticaj surfaktanata prisutnih u FaSSiF i FeSSiF medijumima zabeležen je samo u slučaju referentnog preparata, što je ilustrovano bržim rastvaranjem lekovite supstance (slika 85). Uzimajući u obzir da je metformin-hidrohlid visoko rastvorljiva lekovita supstanca, uočeni efekat se može pripisati poboljšanom kvašenju tableta u prisustvu lecitina i tauroholata. Ovaj efekat nije primećen u FaSSGF, koji sadrži nisku koncentraciju surfaktanata. U viskoznoj sredini, rastvaranje je usporeno kod oba ispitivana preparata. Značajne razlike (karakterisane vrednostima faktora sličnosti manjim od 50) između profila brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida iz dva ispitivana preparata u aparaturi sa lopaticom uočene su u većini ispitivanih medijuma, uključujući viskozni medijum. Slični profili brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom dobijeni su samo u slučaju kada su kao medijumi za ispitivanje korišćeni FaSSiF i FeSSiF ( $f_2$  vrednosti su veće od 50). Izražene razlike između dva ispitivana preparata uočene su i u aparaturi sa protočnom ćelijom, na šta ukazuju vrednosti  $f_2$  niže od 50. Korišćenjem dinamičkih uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja nije bilo moguće postići „brzo rastvaranje leka“ (tj. više od 85% rastvorene lekovite supstance za 30 min) izuzev u slučaju preparata M2 u aparaturi sa protočnom ćelijom, pri brzini protoka medijuma od 8 ml/min. Zanimljivo je da je jedini profil brzine rastvaranja koji je u skladu sa kriterijumima „veoma brzog rastvaranja“ (tj. više od 85% za 15 min), koji bi bio potreban za izostavljanje studija biološke ekvivalencije u slučaju lekova BCS klase 3, dobijen za preparat M2 korišćenjem farmakopejskih uslova ispitivanja.

#### **4.7.5 *In silico* ispitivanja**

U okviru ovog poglavlja biće opisana GI simulacija apsorpcije metformina iz tableta korišćenjem programskih paketa Simcyp<sup>®</sup> i GastroPlus<sup>™</sup>, u cilju mehanističke interpretacije apsorpcije metformina, identifikacije biorelevantne metode i postavljanja klinički relevantnih specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja.

#### 4.7.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa

##### Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije metformina iz GI trakta sprovedena je upotrebom programa *Simcyp*® *Population - Based Simulator* (verzija 13.2, Certara™, SAD) uz primenu fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 64, čije su vrednosti preuzete iz literature i/ili su *in silico* predviđene. S obzirom da su koncentracije metformina u biološkim tečnostima izražene za metformin a ne metformin-hidrohlrid, doza metformina korišćena za simulacije je takođe izražena kao slobodna baza (molekulska masa 129,16 g/mol). U simulacijama je korišćen ADAM model. Karakteristike virtuelnih ispitanika u *in silico* ispitivanju podešene su da odgovaraju realnim učesnicima *in vivo* kliničkog ispitivanja (starost, zastupljenost polova i dr.). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

Tabela 64. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije metformina

Parametar (jedinica mere)	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	129,16
logP <sub>o:w</sub>	-1,43 <sup>a</sup>
Jednokisela baza	
pKa <sub>1</sub>	2,8 <sup>b</sup>
pKa <sub>2</sub>	11,5 <sup>b</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>c</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub>	1 <sup>c</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, P <sub>eff</sub> (cm/s)	Videti Tabelu 65
Rastvorljivost (mg/ml)	500 <sup>d</sup>
Konstanta precipitacije (h <sup>-1</sup> )	4 <sup>e</sup>
Radius čestica lekovite supstance (μm)	10 <sup>e</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>e</sup>
Distribucija	
Potpuni PBPK model, metoda 2	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, V <sub>ss</sub> (L/kg)	0,976 <sup>f</sup>
Eliminacija	
CL <sub>R</sub> (L/h)	31 <sup>c</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	663 <sup>g</sup>
Vreme simulacije (h)	16
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	240

<sup>a</sup> Podatak iz literature (Graham i sar, 2011); <sup>b</sup> Podatak iz literature (Jack, 1992); <sup>c</sup> Podatak iz literature (Tucker i sar, 1981); <sup>d</sup> Objašnjeno u tekstu; <sup>e</sup> *Simcyp*® vrednost; <sup>f</sup> Vrednost izračunata u *Simcyp*®-u korišćenjem potpunog PBPK modela distribucije; <sup>g</sup> Ekvivalentno 850 mg metformin-hidrohlrida;

Uzimajući u obzir da metformin pripada klasi 3 BCS, očekivano je da permeabilnost ispolji najveći uticaj na apsorpciju leka. Kako u literaturi ne postoji podatak o efektivnoj permeabilnosti metformina u GIT-u čoveka, primenjeni su različiti pristupi kako bi se ova vrednost što preciznije procenila:

**pristup a.** Molekulski deskriptori - polarna površina molekula i broj donora vodoničnih veza koji u slučaju metformina iznose 88,99 Å odnosno 4 (Law i sar, 2014);

**pristup b.** Prividna vrednost permeabilnosti određena na paralelnim veštačkim membranama,  $P_{app} = 0,5 \cdot 10^{-6}$  cm/s (Balimane i sar, 2006);

**pristup c.** Prividna vrednost permeabilnosti određena na Caco-2 ćelijskoj kulturi,  $P_{app} = 0,366 \cdot 10^{-6}$  cm/s (Balimane i sar, 2006);

**pristup d.** Prividna vrednost permeabilnosti određena na MDCK ćelijskoj kulturi,  $P_{app} = 1,2 \cdot 10^{-6}$  cm/s (Balimane i sar, 2006);

**pristup e.** Efektivna permeabilnost određena na pacovima korišćenjem SPIP tehnike gde su dobijene sledeće vrednosti:  $4,51 \cdot 10^{-5}$  cm/s za duodenum;  $3,26 \cdot 10^{-5}$  cm/s za jejunum i  $2,96 \cdot 10^{-5}$  cm/s za ileum) (Song i sar, 2006). Za izračunavanje efektivne permeabilnosti kod ljudi korišćena je jednačina koju su dali Fagerholm i sar. (1996).

Dalje, da bi se ispitao efekat aktivnog transporta na apsorpciju metformina efekat relevantnih transportera je uključen u modele označene kao a<sub>t</sub>-d<sub>t</sub>.

Vrednosti efektivne permeabilnosti procenjene na osnovu relevantnih *in silico*, *in vitro* i rezultata ispitivanja na životinjama prikazane su u tabeli 65. Predviđeni profili koncentracije metformina u plazmi, zasnovani na ulaznim  $P_{eff}$  vrednostima dobijenim različitim pristupima prikazani su na slici 87.

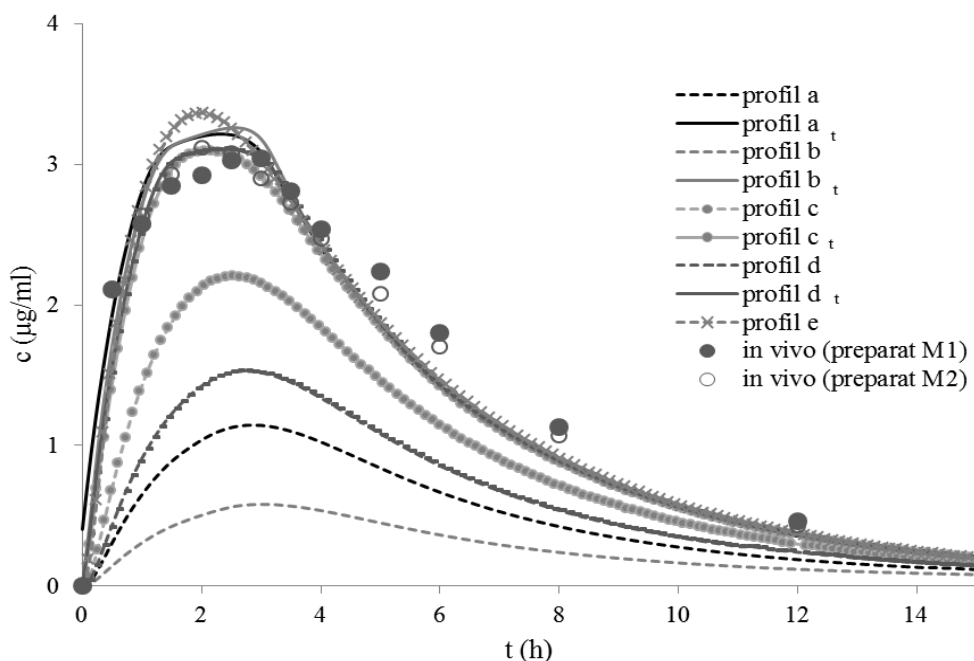
Tabela 65. Vrednosti efektivne permeabilnosti i relativne zastupljenosti transportera koje su korišćene u simulacijama

	$P_{eff} (\cdot 10^{-4}$ cm/s)			Relativna zastupljenost transportera duž GIT-a u poređenju sa Jejunum I						
	Duodenum	Jejunum	Ileum	Duodenum	Jejunum II	Ileum I	Ileum II	Ileum III	Ileum IV	Kolon
pristup a		0,231		35	3	2	1,5	1	1	0
pristup b		0,106		40	4	3	1,5	1	1	0
pristup c		0,535		20	1,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0
pristup d		0,328		30	3	2	1,5	1	1	0
pristup e	1,6	1,1	1,0	-	-	-	-	-	-	0

Što se tiče rastvorljivosti, korišćena je vrednost od 500 mg/ml s obzirom da je to maksimalna vrednost za ovaj parametar koja se može uneti u softver. Iako literaturni podaci ukazuju da je rastvorljivost metformin-hidrohlorida nešto viša (Martindale, 2020) obe vrednosti su daleko iznad granične vrednosti rastvorljivosti pa se ne očekuje da će ovo odstupanje uticati na rezultate simulacija.

Profili a-e i a<sub>t</sub>-d<sub>t</sub> predstavljaju profile koncentracije metformina u plazmi simulirane na osnovu odgovarajućih podataka o permeabilnosti i aktivnom transportu. Vrednosti efektivne permeabilnosti, procenjene na osnovu molekulskih deskriptora i rezultata ispitivanja na PAMPA, bile su niske, što je rezultiralo niskim koncentracijama metformina u plazmi (slika 87, profili a i b, isprekidane linije). Ovakav rezultat je i očekivan s obzirom da literaturni podaci ukazuju da apsorpcija metformina iz GIT-a uključuje i pasivnu difuziju i aktivni transport (Scheen, 1996; Proctor i sar, 2008), a da predviđanja uz korišćenje molekulskih deskriptora i PAMPA testa ne uzimaju u obzir aktivni transport. Slični rezultati dobijeni su sa ulaznim podacima dobijenim na ćelijskim kulturama, tj. Caco-2 i MDCK II ćelijama (slika 87, profili c i d, isprekidane linije). Najbolje poklapanje između *in vivo* dobijenih i *in silico* predviđenih profila, dobijeno je kada su kao ulazni parametri korišćene vrednosti permeabilnosti određene SPIP tehnikom na pacovima (slika 87, profil e), što potvrđuju niske vrednosti %PE za relevantne farmakokinetičke parametre (tabela 66). Vrednost permeabilnosti u debelom crevu ( $0,05 \cdot 10^{-4}$  cm/s) procenjena je korišćenjem *Simcyp*<sup>®</sup> *Parameter Estimation* modula kako bi se postiglo što bolje slaganje simuliranih i *in vivo* profila.

Da bi se ispitaio uticaj aktivnog transporta na apsorpciju metformina, efekat transporterera uključen je u *in silico* modele a<sub>t</sub>-d<sub>t</sub>. Vrednosti maksimalne brzine preuzimanja posredovanog transporterima i Michaelis-Menten konstante preuzete su iz studije Proctor i sar. (2008) i iznose 66 pmol/min cm<sup>2</sup> i 900 μM, redom. Vrednosti relativne zastupljenosti transporterera duž GIT-a u poređenju sa Jejunum II (tabela 65) procenjene su korišćenjem *Simcyp*<sup>®</sup> *Parametar Estimation* modula. Simulirani profili koncentracije metformina u plazmi, zasnovani na procenjenim vrednostima efektivne permeabilnosti sa uključenim aktivnim transportom prikazani su na slici 87 (pune linije). Uključivanjem uticaja transporterera postignuto je mnogo bolje slaganje predviđenih i *in vivo* zabeleženih plazma profila, što je u skladu sa eksperimentalnim podacima iz literature koji govore o značajnom uticaju aktivnog transporta na apsorpciju metformina (Proctor i sar, 2008; Zhou i sar, 2007; Wang i sar, 2003).



Slika 87. Koncentracije metformina u plazmi zabeležene *in vivo* i *in silico* predviđene na osnovu različitih vrednosti efektivnih permeabilnosti: bez transporterera (isprekidane linije) i sa transporterima (pune linije)

Tabela 66. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih greški predviđanja za tablete sa trenutnim oslobađanjem metformina

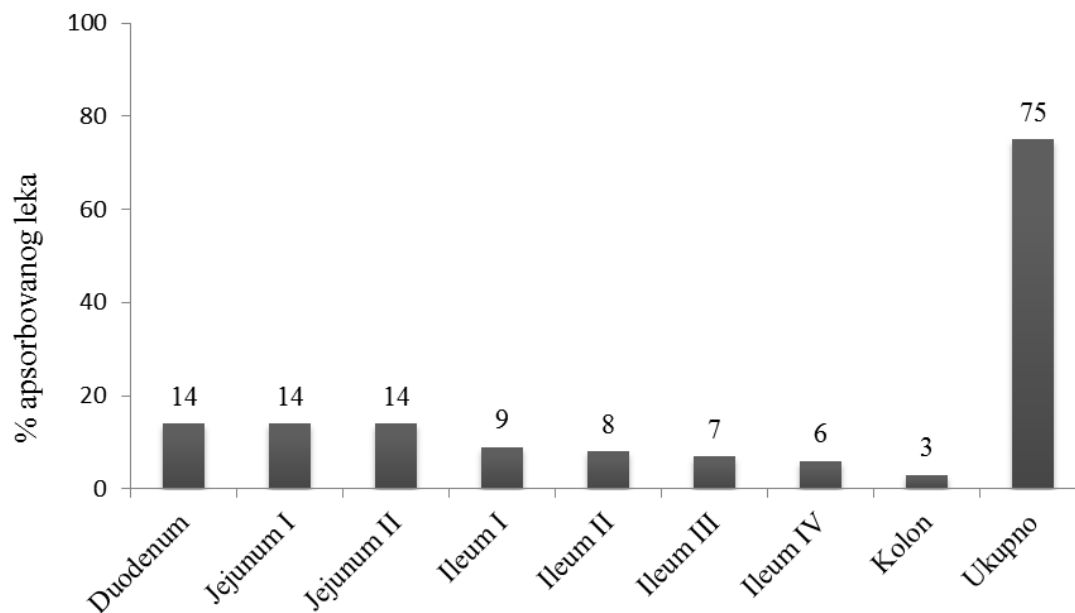
	$C_{max}$ (μg/ml)	%PE	$t_{max}$ (h)	%PE	$PIK_{0-t}$ (μgh/ml)	%PE
<i>Predviđene vrednosti (in silico)</i>						
Profil a <sub>t</sub>	3,22	5,92	2,40	13,35	20,86	0,42
Profil b <sub>t</sub>	3,26	7,23	2,50	9,74	20,81	0,66
Profil c <sub>t</sub>	3,10	1,97	2,16	22,02	20,00	4,53
Profil d <sub>t</sub>	3,11	2,30	2,40	13,35	20,39	2,67
Profil e	3,36	10,52	2,05	25,99	20,90	0,23
<i>Stvarne vrednosti (in vivo)</i>						
Preparat M1	3,04	-	2,77	-	20,95	-

%PE – Greške predviđanja izračunate su na osnovu *in vivo* podataka dobijenih za referentni preparat M1

Generisani *in silico* modeli procenjeni su izračunavanjem procenta greške predviđanja između *in vivo* zabeleženih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara (tabela 66). Uz uključivanje efekta transporterera, predviđeni profili koncentracije metformina u plazmi pokazuju dobro slaganje sa profilima uočenim u *in vivo* studiji (što potvrđuju niske vrednosti %PE

prikazane u tabeli 66). Simcyp® generisana regionalna apsorpcije metformina u različitim segmentima GIT-a prikazana je na slici 88.

Simcyp® generisana regionalna apsorpcija, prikazana na slici 88, pokazuje da se metformin apsorbira duž celog GIT-a pri čemu se najveći procenat apsorpcije odvija u proksimalnom delu tankog creva. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa podacima o regionalnoj apsorpciji metformina iz studije Vidon i sar. (1988). Frakcija neapsorbovanog leka je 25%, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji govore da se između 20 i 30% metformina ne apsorbira i izlučuje se fecesom u nepromenjenom obliku (Quareshi 2006; Pentikäinen i sar, 1979).

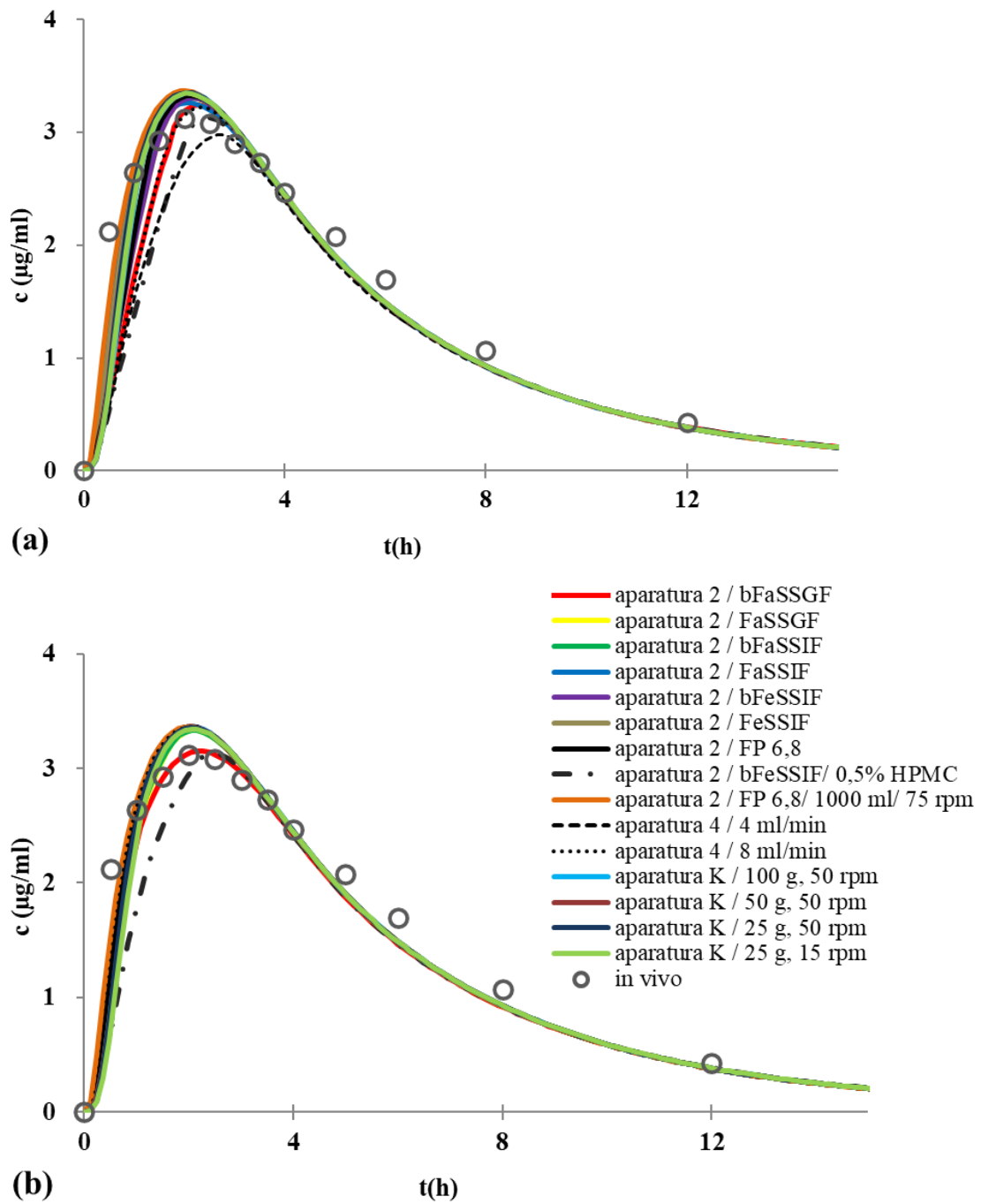


Slika 88. Regionalna apsorpcija metformina u različitim segmentima GIT-a

### Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Da bi se ispitaio uticaj brzine rastvaranja na profil koncentracije metformina u plazmi u funkciji vremena, eksperimentalno dobijeni *in vitro* profili brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida iz tableta korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije. Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 89a za preparat M1, odnosno 89b za preparat M2. Dobijeni rezultati pokazuju da kinetika rastvaranja metformin-hidrohlorida *in vitro* nema značajnog uticaja na njegove performanse *in vivo* što potvrđuju i izračunate greške predviđanja relevantnih farmakokinetičkih parametara prikazane u tabeli 67.

Može se uočiti da jedino u slučajevima kada je *in vitro* rastvaranje sporo i nepotpuno (profili brzine rastvaranja zabeleženi u viskoznom medijumu u aparaturi sa lopaticom i aparaturi sa protočnom ćelijom pri nižoj brzini protoka medijuma) greške predviđanja relevantnih farmakokinetičkih parametara imaju nešto više vrednosti. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Crison i sar. (2012) koji su koristili GastroPlus™ softverski paket kako bi proučavali zavisnost dispozicije metformina od brzine i stepena rastvaranja lekovite supstance. Korišćenjem *in silico* simulacija pokazali su da brzina rastvaranja nema značajnog uticaja na PIK i  $C_{max}$  ukoliko se 100% lekovite supstance rastvori za 2 h ili kraće (Crison i sar, 2012).



Slika 89. Simulirani profili koncentracije metformina u plazmi na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta zajedno sa *in vivo* uočenim profilom za: (a) preparat M1 i (b) preparat M2

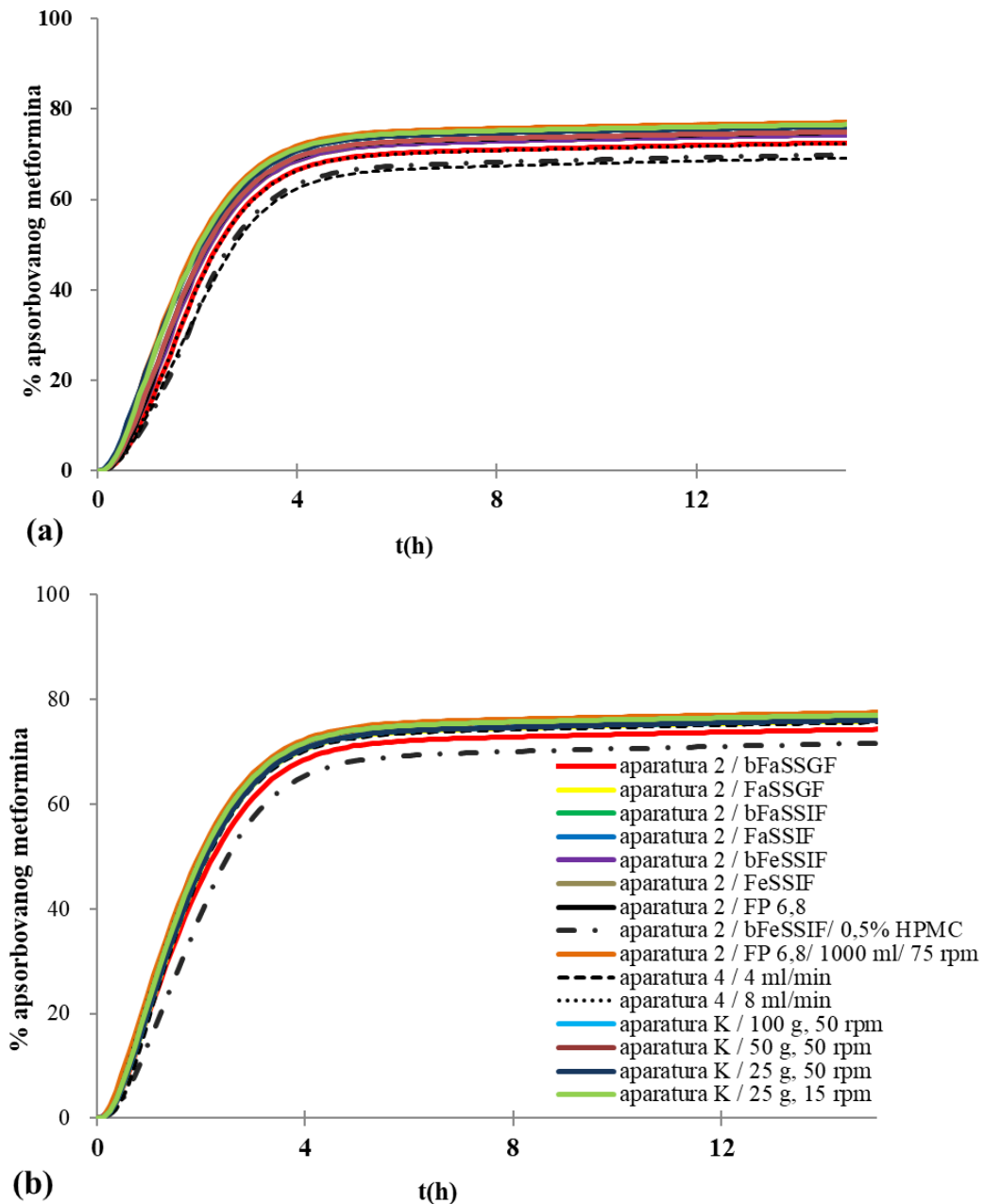
Tabela 67. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja, kao i odgovarajuće greške predviđanja za preparate M1 i M2

<b><i>In vitro</i> profil</b>		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-\infty}$	%PE
Uređaj	Medijum/hidrodinamika	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
<b>Preparat M1</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	3,24	6,57	17,32	0,88	19,65	6,20
	FaSSGF	3,30	8,55	21,66	4,40	20,11	4,00
	bFaSSIF	3,31	8,88	22,02	4,84	20,28	3,19
	FaSSIF	3,26	7,23	25,99	9,69	20,57	1,81
	bFeSSIF	3,30	8,55	21,66	4,40	20,11	4,00
	FeSSIF	3,35	10,19	25,99	9,69	20,09	4,10
	FP pH 6,8	3,32	9,21	22,02	4,84	20,26	3,29
	bFeSSIF/0,5% HPMC	3,13	2,96	13,35	5,72	18,98	9,40
	USP metoda	3,36	10,52	26,35	10,13	20,82	0,62
Aparatura 4	4 ml/min	2,98	1,97	0,00	22,02	18,77	10,40
	8 ml/min	3,22	5,92	17,68	0,44	19,61	6,39
Aparatura K	100 g kuglica, 50 rpm	3,35	10,19	25,99	9,69	20,43	2,48
	50 g kuglica, 50 rpm	3,35	10,19	25,99	9,69	20,53	2,00
	25 g kuglica, 50 rpm	3,35	10,19	26,35	10,13	20,54	1,95
	25 g kuglica, 15 rpm	3,35	10,19	26,35	10,13	20,44	2,43
<b>Preparat M2</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	3,15	3,61	2,17	21,66	20,12	3,96
	FaSSGF	3,33	9,53	2,05	25,99	20,54	1,95
	bFaSSIF	3,33	9,53	2,04	26,35	20,57	1,81
	FaSSIF	3,37	10,85	2,05	25,99	20,82	0,62
	bFeSSIF	3,36	10,52	2,04	26,35	20,86	0,42
	FeSSIF	3,36	10,52	2,04	26,35	20,81	0,66
	FP pH 6,8	3,36	10,52	2,05	25,99	20,82	0,62
	bFeSSIF/0,5% HPMC	3,14	3,28	2,41	12,99	19,45	7,15
	USP metoda	3,37	10,85	2,04	26,35	20,95	0,00
Aparatura 4	4 ml/min	3,35	10,19	2,04	26,35	20,46	2,33
	8 ml/min	3,36	10,52	2,04	26,35	20,81	0,66
Aparatura K	100 g kuglica, 50 rpm	3,35	10,19	2,05	25,99	20,53	2,00
	50 g kuglica, 50 rpm	3,35	10,19	2,05	25,99	20,54	1,95
	25 g kuglica, 50 rpm	3,35	10,19	2,04	26,35	20,58	1,76
	25 g kuglica, 15 rpm	3,34	9,86	2,05	25,99	20,41	2,57
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>3,04</b>		<b>2,77</b>		<b>20,95</b>	

### Identifikacija profila apsorpcije metformina primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija procesa apsorpcije metformina iz tableta sprovedena je korišćenjem validiranog modela GI simulacije. Cilj ovih ispitivanja bio je da se proceni mogućnost primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju hipotetičkih input profila i uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa.



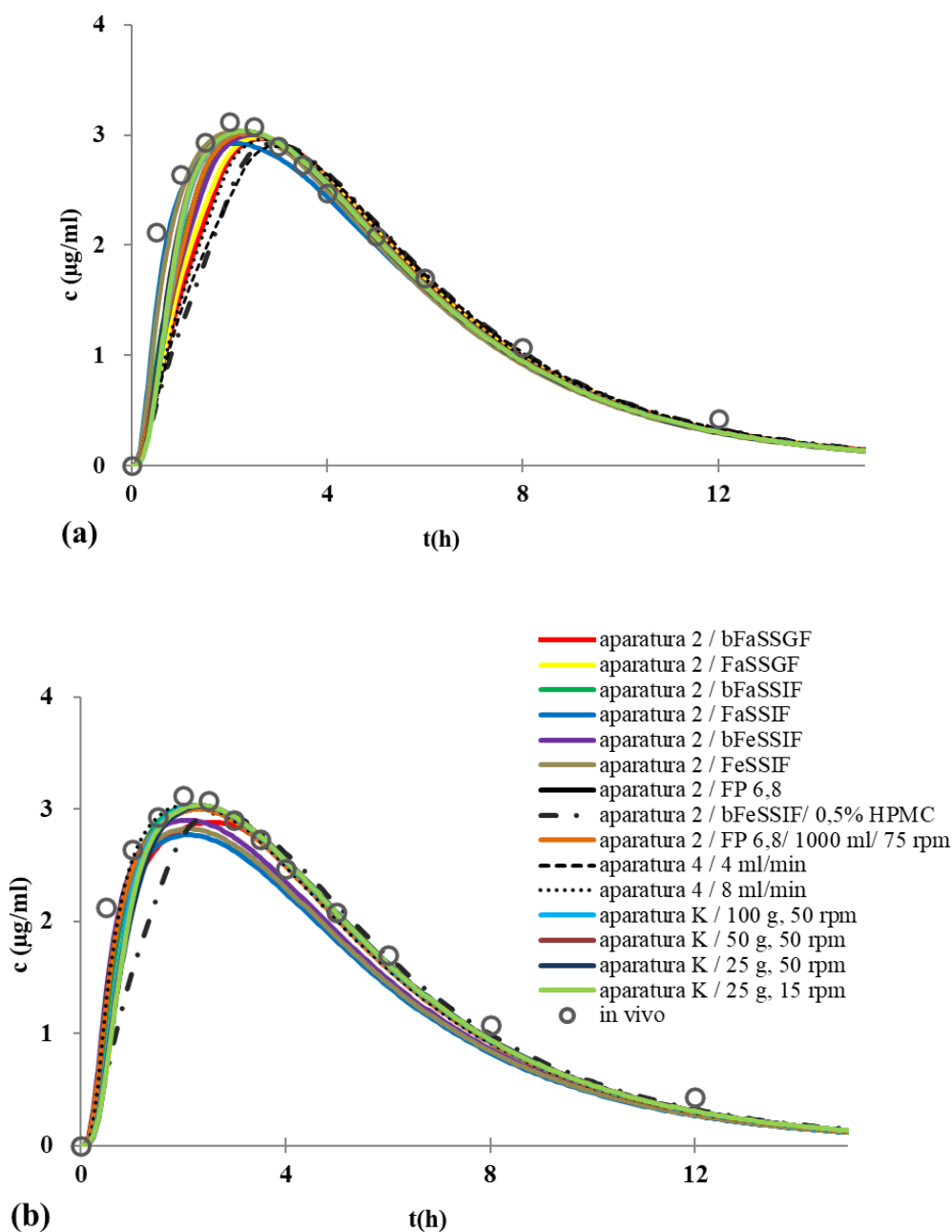


Slika 90. Simulirani profili apsorpcije metformina na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida iz tableta za: (a) preparat M1 i (b) preparat M2

*In silico* dobijeni profili apsorpcije metformina iz tableta dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 90a za preparat M1 odnosno 90b za preparat M2. Može se uočiti da se apsorpcija metformina odvija relativno brzo (u prvih 4 h ispitivanja) što takođe ukazuje da se najveći procenat apsorpcije odvija u proksimalnom delu tankog creva, kao i da brzina rastvaranja metformin-hidrohlorida nema značajnog uticaja na obim i brzinu apsorpcije kod oba ispitivana preparata. Predviđeni obim apsorpcije od oko 70% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti metformina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Quareshi 2006; Pentikäinen i sar. 1979).

#### 4.7.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja iste vrednosti ulaznih parametara (prikazane u tabeli 64), korišćene su u okviru komercijalno dostupnog GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) programskog paketa, sa ciljem da se korišćenjem GI simulacije identifikuju profili apsorpcije. Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija, izuzev vrednosti ASF faktora koji su optimizovani i u svim delovima GIT-a izuzev želuca iznose 1,5. Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode Rodgers i Rowland i dobijena je vrednost od 1,040 L/kg što odgovara vrednosti predviđenoj u Simcyp®-u.



Slika 91. Profili koncentracije metformina u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja zajedno sa *in vivo* uočenim profilom za: (a) preparat M1 i (b) preparat M2

Profili koncentracije metformina u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida iz tableta zajedno sa in vivo uočenim profilom prikazani su na slici 91a za preparat M1, odnosno slici 91b za preparat M2, dok su odgovarajuće greške predviđanja relevantnih farmakokinetičkih parametara date u tabeli 68.

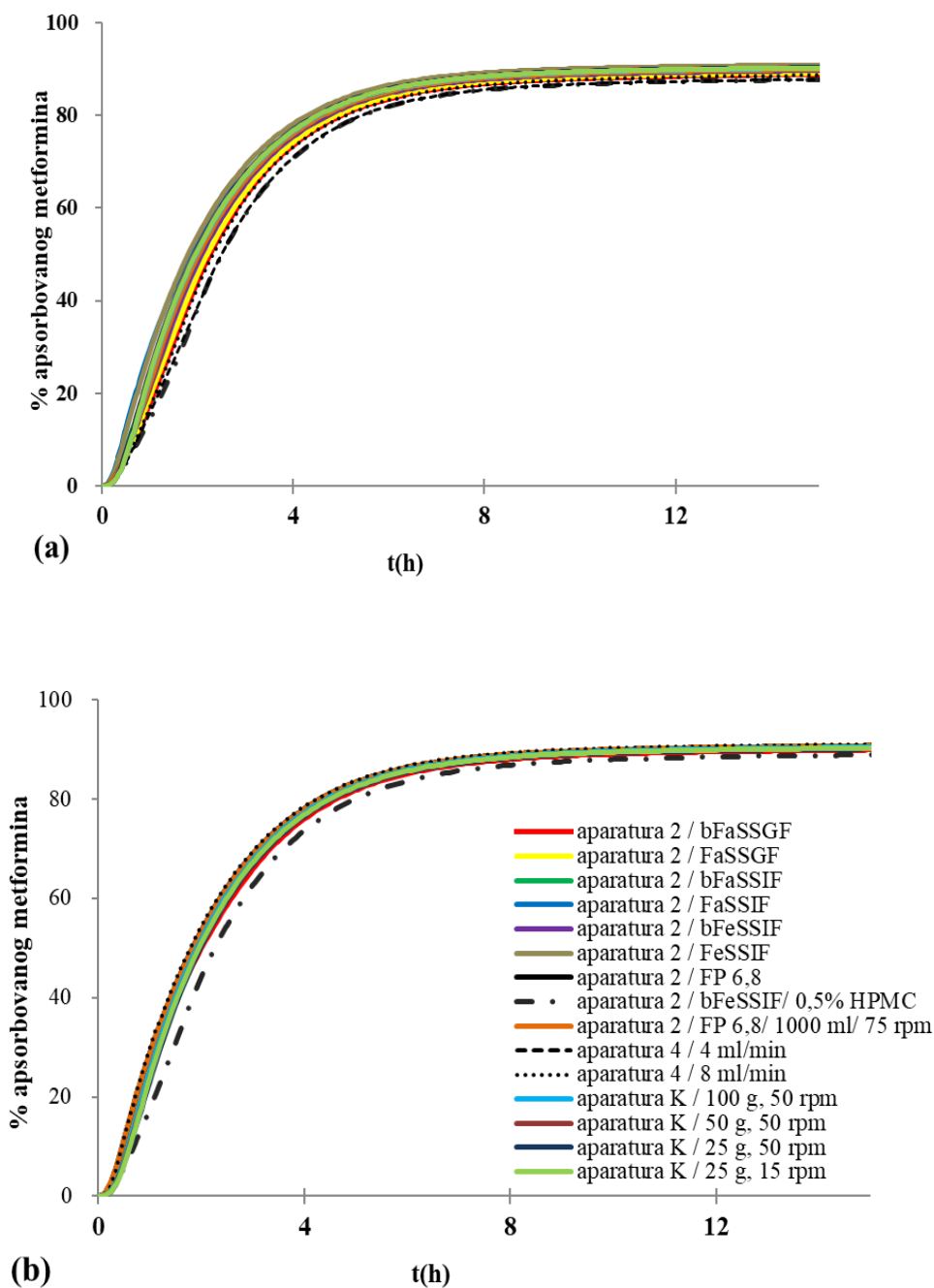
Može se uočiti da se i GI simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa pokazala uspešnom u predviđanju profila koncentracije metformina u plazmi, te da su dobijene relativno niske vrednosti greški predviđanja za  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ , iako nešto više nego što je slučaj sa vrednostima dobijenim simulacijom u Simcyp®-u. Dobijeni rezultati takođe pokazuju da se ne predviđa da kinetika rastvaranja metformina in vitro značajno utiče na njegove performanse in vivo.

Tabela 68. Farmakokinetički parametri predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja, kao i odgovarajuće greške predviđanja za preparate M1 i M2

<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/Hidrodinamika	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
<b>Preparat M1</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	2,96	2,63	2,64	4,69	18,32	12,55
	FaSSGF	2,98	1,97	2,64	4,69	18,54	11,50
	bFaSSIF	3,00	1,31	2,40	13,35	18,96	9,49
	FaSSIF	2,92	3,94	2,16	22,02	17,56	16,18
	bFeSSIF	3,00	1,31	2,48	10,46	18,68	10,83
	FeSSIF	3,04	0,00	2,16	22,02	19,06	9,02
	FP pH 6,8	3,01	0,98	2,40	13,35	19,00	9,30
	bFeSSIF/0,5% HPMC	2,92	3,94	2,88	3,97	17,23	17,75
	USP metoda	3,01	0,98	2,42	12,63	19,05	9,06
Aparatura 4	4 ml/min	2,89	4,93	2,96	6,85	17,00	18,85
	8 ml/min	2,95	2,96	2,72	1,80	17,86	14,74
Aparatura K	100 g kuglica, 50 rpm	3,03	0,32	2,32	16,24	18,50	11,69
	50 g kuglica, 50 rpm	3,03	0,32	2,32	16,24	18,52	11,59
	25 g kuglica, 50 rpm	3,03	0,32	2,32	16,24	18,51	11,64
	25 g kuglica, 15 rpm	3,03	0,32	2,32	16,24	18,50	11,69
<b>Preparat M2</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	2,88	5,26	2,56	7,58	17,25	17,66
	FaSSGF	3,01	0,98	2,24	19,13	19,10	8,83
	bFaSSIF	3,03	0,32	2,16	22,02	19,25	8,11
	FaSSIF	2,77	8,88	2,08	24,90	17,00	18,85
	bFeSSIF	2,90	4,60	2,08	24,90	17,80	15,03
	FeSSIF	3,01	0,98	2,16	22,02	19,10	8,83
	FP pH 6,8	3,00	1,31	2,24	19,13	18,52	11,59
	bFeSSIF/0,5% HPMC	2,90	4,60	2,90	4,69	17,48	16,56
	USP metoda	3,04	0,00	2,14	22,74	19,12	8,73
Aparatura 4	4 ml/min	3,04	0,00	2,32	16,24	18,76	10,45
	8 ml/min	3,04	0,00	2,16	22,02	19,42	7,30
Aparatura K	100 g kuglica, 50 rpm	3,04	0,00	2,24	19,13	19,12	8,73
	50 g kuglica, 50 rpm	3,03	0,32	2,32	16,24	19,00	9,30
	25 g kuglica, 50 rpm	3,03	0,32	2,32	16,24	19,02	9,21
	25 g kuglica, 15 rpm	3,03	0,32	2,32	16,24	19,00	9,30
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>3,04</b>		<b>2,77</b>		<b>20,95</b>	

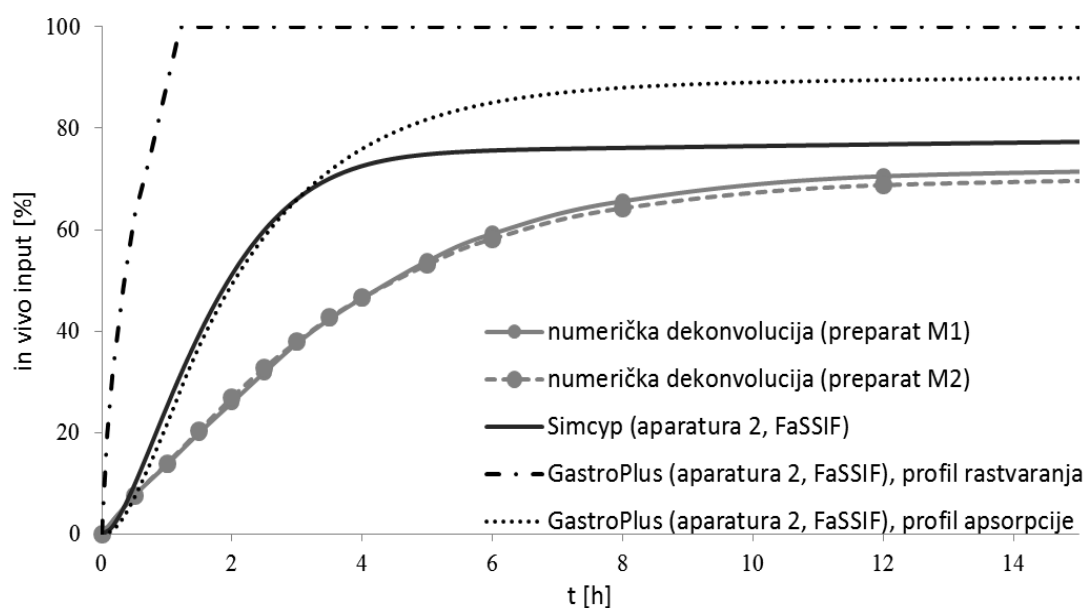
## Identifikacija profila apsorpcije metformina primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

Hipotetički profili apsorpcije metformina dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u prikazani su na slici 92a za preparat M1, odnosno slici 92b za preparat M2. Može se uočiti nešto sporija apsorpcija metformina, ali i značajno viši obim apsorpcije (oko 90%) nego što je to slučaj sa GI simulacijom u Simcyp®-u. Predviđeni obim apsorpcije nešto je veći u odnosu na literaturne podatke o biološkoj raspoloživosti metformina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Quareshi 2006; Pentikäinen i sar. 1979).



Slika 92. Profili apsorpcije metformina za tableta (a) preparat M1 i (b) preparat M2 dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u

Na slici 93 prikazani su *in vivo* input profili metformina dobijeni različitim metodama dekonvolucije za tablete sa trenutnim oslobađanjem (preparat M1).



Slika 93. *In vivo* input profili metformina dobijeni različitim metodama dekonvolucije (preparat M1)

Mogu se uočiti značajne razlike između *in vivo* input profila u zavisnosti od primenjenog metoda dekonvolucije (slika 93). Profili dobijeni numeričkom dekonvolucijom koristeći profil nakon intravenske primene leka kao referentni ukazuje na sporu apsorpciju metformina koja se odvija duž čitavog GIT-a. Profil apsorpcije leka procenjen GI simulacijom u Simcyp®-u odražava relativno brzu apsorpciju, pri čemu se faza platoa dostiže nakon približno 3 h. Ukupna frakcija apsorbovanog metformina iznosi oko 75%. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa ograničenom apsorpcijom metformina koja se pretežno javlja u proksimalnom delu tankog creva. Profil apsorpcije dobijen GI simulacijom u GastroPlus™-u ukazuje na obim apsorpcije od 90% što značajno prevazilazi literaturne podatke o obimu apsorpcije metformina koji se kreće oko 70%. Ako uporedimo profil rastvaranja i simulirani profil apsorpcije metformina GI simulacijom u GastroPlus™-u može se uočiti da se apsorpcija značajno sporije odvija što je u saglasnosti sa niskom permeabilnosti ispitivane lekovite supstance.

#### 4.7.6 *In vitro-in vivo* korelacija

##### Dekonvolucionni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati primenom različitih metoda analizirani su u odnosu na *in vitro* rezultate brzine rastvaranja metformina iz ispitivanih preparata pod različitim eksperimentalnim uslovima. S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale, TS. Hipotetički input profili dobijeni korišćenjem različitih dekonvolucionih metoda, kao i eksperimentalni profili brzine rastvaranja fitovani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Vrednosti faktora TS izračunate su kao odnos  $\tau_{d\text{vivo}}$  i  $\tau_{d\text{vitro}}$  (tabela 69). Može se uočiti da se vrednosti faktora TS značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene dekonvolucione metode, kao i profila brzine rastvaranja i kreću se u opsegu 2,5 do 21,9.

Tabela 69. Parametri Weibull-ove distribucije profila brzine rastvaranja metformin-hidrohlorida iz tableta i odgovarajući faktori skaliranja vremenske ose za preparate M1 i M2

Uređaj	<i>In vitro</i> profil Medijum/ Hidrodinamika	$\tau_d$ (h)	$\beta$	TS		
				Numerička dekolucija	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
<b>Preparat M1</b>						
Aparatura 2	bFaSSGF	0,38	0,73	10,4	5,3	5,5
	FaSSGF	0,41	0,86	9,6	4,9	5,1
	bFaSSIF	0,29	0,74	13,6	7,0	7,2
	FaSSIF	0,22	0,97	17,9	9,2	9,5
	bFeSSIF	0,36	0,79	11,0	5,6	5,8
	FeSSIF	0,25	1,02	15,8	8,0	8,4
	FP pH 6,8	0,38	0,83	10,4	5,3	5,5
	bFeSSIF/0,5% HPMC USP metoda	0,35 0,23	0,59 1,08	11,3 17,2	5,8 8,8	5,9 9,1
Aparatura 4	4ml/min	0,40	0,92	9,9	5,0	5,2
	8ml/min	0,40	0,92	9,9	5,0	5,2
Aparatura K	100g kuglica, 50 rpm	0,49	1,57	8,0	4,1	4,3
	50 g kuglica, 50 rpm	0,42	1,60	9,4	4,8	4,9
	25 g kuglica, 50 rpm	0,42	1,64	9,4	4,8	4,9
	25 g kuglica, 15 rpm	0,47	1,68	8,4	4,3	4,4
<b>Preparat M2</b>						
Aparatura 2	bFaSSGF	0,25	1,42	15,8	8,0	8,4
	FaSSGF	0,24	1,28	16,4	8,4	8,7
	bFaSSIF	0,25	1,30	15,8	8,0	8,4
	FaSSIF	0,18	1,73	21,9	11,2	11,6
	bFeSSIF	0,18	1,73	21,9	11,2	11,6
	FeSSIF	0,19	1,50	20,8	10,6	11,0
	FP pH 6,8	0,19	1,19	20,8	10,6	11,0
	bFeSSIF/0,5% HPMC USP metoda	0,79 0,26	0,75 1,37	5,0 15,2	2,5 7,7	2,6 8,0
Aparatura 4	4ml/min	0,46	1,82	8,6	4,4	4,5
	8ml/min	0,24	1,99	16,5	8,4	8,7
Aparatura K	100g kuglica, 50 rpm	0,43	1,75	9,2	4,7	4,9
	50 g kuglica, 50 rpm	0,43	1,71	9,2	4,7	4,9
	25 g kuglica, 50 rpm	0,42	1,79	9,4	4,8	4,9
	25 g kuglica, 15 rpm	0,41	1,82	9,6	4,9	5,1

Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom podataka nakon korekcije vremenske ose prikazani su u tabeli 70. Najveći koeficijenti korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka dobijeni su za profile brzine rastvaranja koji su dobijeni u aparaturi sa staklenim kuglicama ( $r > 0,99$ ). Relevantne vrednosti nagiba pravca variraju u opsegu 0,629-2,044. Ovi rezultati jasno ukazuju da se profil rastvaranja metformina u aparaturi sa staklenim kuglicama poklapa sa predviđenim profilima apsorpcije. Zanimljivo je da je najviši nivo IVIVK dobijen za profil brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FeSSIF kao medijuma za rastvaranje. Ovakav rezultat ukazuje da što je brže rastvaranje *in vitro*, može se očekivati bolja IVIVK za lekove koji pripadaju BCS klasi 3 kao što je metformin.

Tabela 70. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> input/ <i>in vivo</i> input		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Numerička dekonvolucija	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uređaj	Medijum/hidrodinamika				
<b>Preparat M1</b>					
Aparatura 2	bFaSSGF	a	1,1041	0,9051	0,9952
		r	0,8782	0,8847	0,8706
	FaSSGF	a	1,1874	0,9607	0,9994
		r	0,8902	0,8948	0,8857
	bFaSSIF	a	1,2393	1,1305	0,8878
		r	0,9542	0,9549	0,9869
	FaSSIF	a	1,3281	1,0757	1,0041
		r	0,9530	0,9550	0,9823
	bFeSSIF	a	1,9438	0,8531	0,9780
		r	0,7755	0,8310	0,9905
	FeSSIF	a	1,3521	1,0865	0,9858
		r	0,9874	0,9917	0,9937
	FP pH 6,8	a	1,0686	0,8748	1,0021
		r	0,8607	0,8644	0,8870
bFeSSIF/0,5% HPMC	a	0,7702	0,6299	0,8083	
	r	0,9096	0,9031	0,9305	
USP metoda	a	1,1218	0,9610	1,0017	
	r	0,8886	0,8961	0,8854	
Aparatura 4	4 ml/min	a	1,3897	1,1448	0,9133
		r	0,8266	0,8385	0,8710
	8 ml/min	a	0,9065	0,7668	0,9728
		r	0,5737	0,5975	0,8755
Aparatura K	100 g kuglica, 50 rpm	a	1,8087	1,4447	1,1129
		r	0,9924	0,9924	0,9917
	50 g kuglica, 50 rpm	a	1,8858	1,4701	1,1057
		r	0,9996	0,9997	0,9954
	25 g kuglica, 50 rpm	a	2,0447	1,6597	1,1204
		r	0,9976	0,9994	0,9994
	25 g kuglica, 15 rpm	a	1,9018	1,5177	1,1157
		r	0,9971	0,9961	0,9991
<b>Preparat M2</b>					
Aparatura 2	bFaSSGF	a	1,2897	1,2568	1,0839
		r	0,9974	0,9811	0,9882
	FaSSGF	a	1,3111	1,2501	1,0967
		r	0,9960	0,9784	0,9853
	bFaSSIF	a	1,2752	1,2568	1,0857
		r	0,9968	0,9825	0,9684
	FaSSIF	a	1,3067	1,2244	1,2088
		r	0,9944	0,9671	0,9722
	bFeSSIF	a	1,2956	1,2250	1,1787
		r	0,9953	0,9685	0,9884
	FeSSIF	a	1,3318	1,1288	1,1861
		r	0,9975	0,9714	0,9785
	FP pH 6,8	a	1,3252	1,2609	1,0758
		r	0,9966	0,9877	0,9757
bFeSSIF/0,5% HPMC	a	1,2337	1,2468	1,1454	
	r	0,9894	0,9812	0,9859	
USP metoda	a	1,3018	1,3021	1,0431	
	r	0,9943	0,9940	0,9850	
Aparatura 4	4 ml/min	a	1,4157	1,3875	1,2118
		r	0,9814	0,9732	0,9826
	8 ml/min	a	1,3016	1,3877	1,2202
		r	0,9973	0,9694	0,9741
Aparatura K	100 g kuglica, 50 rpm	a	1,3727	1,2508	1,1998
		r	0,9771	0,9565	0,9819
	50 g kuglica, 50 rpm	a	1,3707	1,2679	1,1503
		r	0,9724	0,9638	0,9875
	25 g kuglica, 50 rpm	a	1,2558	1,2031	1,1022
		r	0,9795	0,9652	0,9857
25 g kuglica, 15 rpm	a	1,2637	1,2623	1,1565	
	r	0,9805	0,9684	0,9986	

## Konvolucionni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije, profili koncentracije metformina u plazmi predviđeni primenom GI simulacije u Simcyp® i GastroPlus™ programskim paketima na osnovu različitih *in vitro* profila brzine rastvaranja, analizirani su u odnosu na srednji farmakokinetički profil uočen u *in vivo* studiji Homšek i sar. (2010). Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 71 ukazuju na visok nivo IVIVK analiziranih setova podataka. Najviši nivo korelacije, opisan vrednošću koeficijenta korelacije većim od 0,95 i nagibom regresione prave blizu jedinice, dobijen je za *in vitro* eksperimentalne uslove u kojima su korišćeni fiziološki zasnovani medijumi (tj. FaSSIF i FeSSIF) u aparaturi sa lopaticom. Mala odstupanja od IVIVK primećena su samo u slučajevima kada su za simulaciju korišćeni profili koji pokazuju sporo i nepotpuno rastvaranje leka (*in vitro* profili dobijeni u viskoznom medijumu i pri nižoj brzini protoka u aparaturi sa protočnom ćelijom).

Tabela 71. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije (konvolucionni pristup)

<i>In vitro</i> profil		Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
Uređaj	Medijum/hidrodinamika	a	r	a	r
<b>Preparat M1</b>					
Aparatura 2	bFaSSGF	1,0081	0,9344	0,9417	0,9169
	FaSSGF	1,0574	0,9432	0,9154	0,8258
	bFaSSIF	1,0645	0,9515	0,8615	0,9007
	FaSSIF	1,0852	0,9688	0,9962	0,9864
	bFeSSIF	1,0710	0,9395	0,9257	0,9425
	FeSSIF	1,0964	0,9622	0,9564	0,9834
	FP pH 6,8	1,0798	0,9487	0,9982	0,9882
	bFeSSIF/0,5% HPMC USP metoda	0,9287 1,1021	0,8954 0,9422	0,8921 0,9980	0,8745 0,9894
Aparatura 4	4 ml/min	0,9360	0,9065	0,9185	0,8892
	8 ml/min	1,0455	0,9336	0,9104	0,9101
Aparatura K	100 g kuglica, 50 rpm	1,0824	0,9353	0,8991	0,94385
	50 g kuglica, 50 rpm	1,0871	0,9412	0,9035	0,9483
	25 g kuglica, 50 rpm	1,0910	0,9395	0,8977	0,9455
	25 g kuglica, 15 rpm	1,0808	0,9304	0,9055	0,9455
<b>Preparat M2</b>					
Aparatura 2	bFaSSGF	1,0060	0,9545	0,9829	0,9725
	FaSSGF	1,0081	0,9472	0,9518	0,9732
	bFaSSIF	1,0144	0,9510	0,9445	0,9751
	FaSSIF	1,0087	0,9481	1,0444	0,9980
	bFeSSIF	1,0102	0,9504	1,0001	0,9851
	FeSSIF	1,0125	0,9525	1,0010	0,9810
	FP pH 6,8	1,0014	0,9522	1,0001	0,9894
	bFeSSIF/0,5% HPMC USP metoda	0,9685 1,0052	0,8854 0,9622	0,8630 1,0011	0,8711 0,9980
Aparatura 4	4 ml/min	0,9423	0,9018	0,8995	0,9455
	8 ml/min	1,0012	0,9835	0,9434	0,9790
Aparatura K	100 g kuglica, 50 rpm	1,0225	0,9062	0,9121	0,9542
	50 g kuglica, 50 rpm	1,0204	0,9234	0,9205	0,9485
	25 g kuglica, 50 rpm	1,0255	0,9252	0,9138	0,9501
	25 g kuglica, 15 rpm	1,0107	0,9301	0,9155	0,9650

a – nagib regresione prave; r – koeficijent korelacije



Ovakvi rezultati govore u prilog činjenici da će apsorpcija lekova BCS klase 3, kao što je metformin, zavistiti uglavnom od permeabilnosti leka ukoliko je rastvaranje brzo, a koncentracija leka dovoljno visoka da omogući maksimalan stepen apsorpcije leka

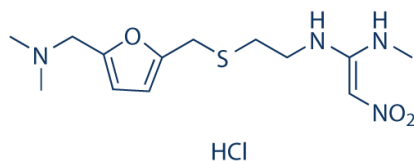
Primena dekonvolucionog i konvolucionog pristupa uspostavljanju IVIVK dovela je do različitih ishoda. Naime, rezultati konvolucionog pristupa pokazuju veoma male razlike u odnosu na *in vitro* profil koji je korišćen za predviđanje, što nije slučaj sa rezultatima dobijenim dekonvolucionim metodom. Gaynor i sar. (2008) istakli su da stepen apsorpcije predviđen postupkom dekonvolucije može značajno varirati u zavisnosti od *in vitro* podataka koji se koriste. Stoga se rezultati IVIVK dobijeni primenom konvolucionog pristupa u ovom slučaju mogu smatrati pouzdanijim.

Ispitivanje brzine rastvaranja dva biološki ekvivalentna preparata sa trenutnim oslobađanjem metformina je pokazalo da je brzina rastvaranja generičkog preparata generalno veća i manje podložna uticaju eksperimentalnih uslova. U aparaturi sa lopaticom uticaj fizioloških surfaktanata zabeležen je u slučaju referentnog preparata, što je ilustrovano nešto bržim rastvaranjem lekovite supstance. Uzimajući u obzir da je metformin-hidrohlorid lako rastvorljiva lekovita supstanca, uočeni efekat se može pripisati povećanom kvašenju tableta u prisustvu lecitina i tauroholata. U viskoznom medijumu rastvaranje je usporeno kod oba ispitivana preparata. U aparaturi sa lopaticom, u većini ispitivanih medijuma, osim FaSSIF i FeSSIF, uočene su značajne razlike u brzini rastvaranja između ispitivanih preparata. Izražene razlike između ispitivanih preparata uočene su i u aparaturi sa protočnom ćelijom, gde je povećanje brzina protoka značajno uticalo na brzinu rastvaranja iz generičkog preparata, dok kod referentnog preparata to nije bio slučaj. Slični profili brzine rastvaranja ispitivanih preparata dobijeni su u aparaturi sa staklenim kuglicama pri svim eksperimentalnim postavkama. Dobijeni rezultati ukazuju da fiziološki zasnovani medijumi u aparaturi sa lopaticom i primena aparature sa staklenim kuglicama obezbeđuju bioprediktivne uslove ispitivanja, dok su ostali eksperimentalni uslovi previše diskriminativni i ukazuju na razlike između formulacija koje nisu zabeležene *in vivo*.

Gastrointestinalna simulacija uspešno je korišćena za predviđanje farmakokinetičkog profila metformina koristeći različite podatke o efektivnoj permeabilnosti leka. Sprovedene simulacije su pokazale da nema značajnog uticaja *in vitro* brzine rastvaranja na profil apsorpcije metformina *in vivo* ako je više od 65% lekovite supstance rastvoreno nakon 60 min. Najbolje slaganje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti osnovnih farmakokinetičkih parametara uočeno je kod oba ispitivana preparata za profile brzine rastvaranja dobijene u aparaturi sa lopaticom, uz primenu FaSSIF i FeSSIF medijuma, i za profile dobijene u aparaturi sa staklenim kuglicama. Predviđeni obim apsorpcije od oko 70% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti metformina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Nivo A IVIVK bilo je moguće uspostaviti primenom oba pristupa (i konvolucionog i dekonvolucionog), pri čemu je prilikom primene konvolucionog pristupa bila manje izražena razlika između ispitivanih preparata.

Dobijeni rezultati govore u prilog ideji da brzina rastvaranja lekova koji pripadaju BCS klasi 3 ne mora da bude u skladu sa „veoma brzim“ rastvaranjem kako bi se obezbedila potpuna apsorpcija, već se može postaviti i nešto šira klinički relevantna specifikacija.

## 4.8 MODEL SUPSTANCA: RANITIDIN-HIDROHLORID



N-[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]tio]etil]-N'-metil-2-nitro-1,1-etendiamin

Slika 94. Strukturna formula i hemijski naziv ranitidin-hidrohlorida

Ranitidin pripada grupi antagonista  $H_2$  receptora. Namenjen je lečenju različitih stanja i bolesti u kojima je pojačano lučenje želudačne kiseline, kao što su terapija i prevencija ulkusa želuca i duodenuma i gastroezofagealni refluks. Detaljan pregled fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i biofarmaceutskih svojstava ranitidina prikazan je u okviru odgovarajuće FIP Biowaiver monografije (Kortejärvi i sar, 2005). U Republici Srbiji, ranitidin je dostupan u vidu film tableta i šumećih tableta u dozi od 75, 150 i 300 mg, u obliku ranitidin-hidrohlorida (ALIMS, 2022).

### 4.8.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva ranitidina

Rastvorljivost ranitidin-hidrohlorida u vodi je 660 mg/ml (Martindale, 2020) i, uzimajući u obzir najveću pojedinačnu dozu, vrednost Doznog broja iznosi 0,0018, te se opisuje kao visoko rastvorljiva supstanca. Particioni koeficijent oktanol:voda iznosi 1,28 (ACD/Labs Software™). Okarakterisan je sa dve pKa vrednosti 8,2 i 2,7 (Carey i sar, 1981).

Biolška raspoloživost ranitidina nakon oralne primene iznosi 30-70% (Garg i sar, 1981; Martin i sar, 1982). U literaturi je opisana pojava dvostrukog pika nakon oralne primene, nakon 0,5-1,5 h, i nakon 3-4 h (Woodings i sar, 1980; Van Hecken i sar, 1982). Takođe je prikazano da je biološka raspoloživost ranitidina značajno niža nakon primene rastvora direktno u kolon u poređenju sa aplikacijom u želudac, jejunum ili ileum (Williams i sar, 1992; Pithavala i sar, 1998). Ovakvi rezultati ukazuju na paracelularni put apsorpcije ranitidina, kao i da se apsorpcija ranitidina primarno odvija u tankom crevu. Hrana ne utiče značajno na brzinu i obim apsorpcije ranitidina (Mc Neil i sar, 1981). Rezultati ispitivanja permeabilnosti, generalno, ukazuju na to da je permeabilnost ranitidina niska (Yazdanian i sar, 2004; Takamatsu i sar, 2001). Takođe je pokazano da je ranitidin supstrat za P-glikoprotein (Collet i sar, 1999; Yazdanian i sar, 2004; Lentz i sar, 2000).

Prividni volumen distribucije iznosi 1,16-1,87 L/kg (Garg i sar, 1981; Van Hecken i sar, 1982; Mc Neil i sar, 1981; Lebert i sar, 1981). Vezivanje ranitidina za proteine plazme iznosi oko 15% (Garg i sar, 1981). Nakon i.v. primene oko 70% ranitidina se u nepromenjenom obliku izlučuje urinom, dok renalna eliminacija nakon oralne primene iznosi 25-30%, manje od 10% leka metaboliše se u jetri (Carey i sar, 1981; Martin i sar, 1982; Garg i sar, 1981). Poluvreme eliminacije iznosi 1,7-2,1 h (Garg i sar, 1981; Mignon i sar, 1982).

Ranitidin-hidrohlorid pokazuje polimorfizam. Pokazano je da su tablete sa trenutnim oslobađanjem koje sadrže različite polimorfne oblike ranitidin-hidrohlorida biološki ekvivalentne (Shen i sar, 1995).

## 4.8.2 *In vivo* podaci

Nakon opsežnog pretraživanja *in vivo* studija dostupnih u literaturi, izabrani su profili koncentracija ranitidina u plazmi koji će se koristiti kao referentni. U cilju biofarmaceutske karakterizacije korišćeni su literaturni profili koncentracija ranitidina u plazmi nakon intravenske primene (Van Hecken i sar, 1982), i oralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem (Sadray i sar, 2003).

Van Hecken i sar. (1982) poredili su farmakokinetiku ranitidina nakon i.v. primene i nakon oralne primene u vidu tableta sa trenutnim oslobađanjem. U studiji su određeni osnovni farmakokinetički parametri, izračunata apsolutna biloška raspoloživost leka, a pokazano je i da ranitidin podleže intenzivnom metabolizmu u jetri. Sadray i sar. (2003) ispitivali su bioekvivalenciju dva komercijalna preparata ranitidin-hidrohlorida (referentnog i generičkog) i poredili izračunate farmakokinetičke parametre analizom uzoraka plazme i urina. Pokazali su da vrednosti farmakokinetičkih parametara značajno variraju u zavisnosti od analiziranog uzorka, kao i da se dvostruki pik ne uočava analizom uzoraka urina.

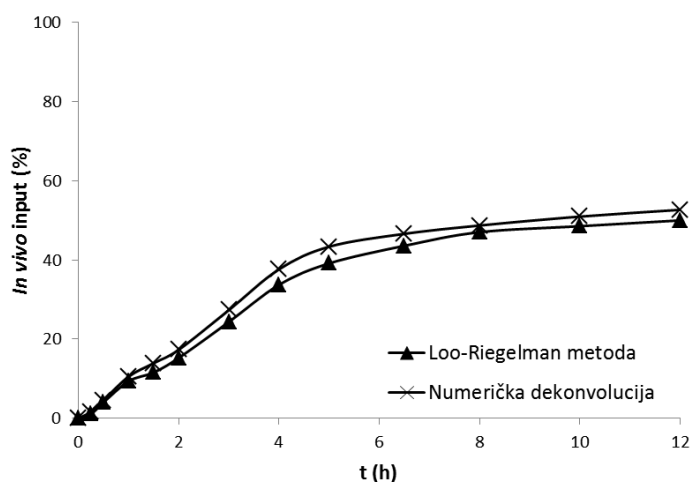
Osnovni farmakokinetički parametri uočeni nakon primene izabranih farmaceutskih oblika ranitidin-hidrohlorida prikazani su u tabeli 72.

Tabela 72. Farmakokinetički parametri različitih farmaceutskih oblika ranitidin-hidrohlorida

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> (µg/h/ml)	C <sub>max1</sub> (µg/ml)	C <sub>max2</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max1</sub> (h)	t <sub>max2</sub> (h)	Referenca
i.v. bolus injekcija (150 mg)	3,93	10,44	/	1,73	/	/	Van Hecken i sar, 1982
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (150 mg)	1,86	0,21	0,32	2,12	1,1	3,8	Sadray i sar, 2003

## 4.8.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila ranitidina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

U cilju dobijanja profila brzine apsorpcije ranitidina *in vivo* primenjene su različite metode konvencionalne farmakokinetičke analize i to: Loo-Riegelman metoda i numerička dekonvolucija u odnosu na profil dobijen nakon intravenske primene, upotrebom softverskog paketa Kinetica 5.0 i literaturnih profila koncentracija ranitidina u plazmi nakon primene analiziranih preparata.



Slika 95. *In vivo* input profili ranitidina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Sadray i sar, 2003) dobijeni primenom različitih farmakokinetičkih metoda

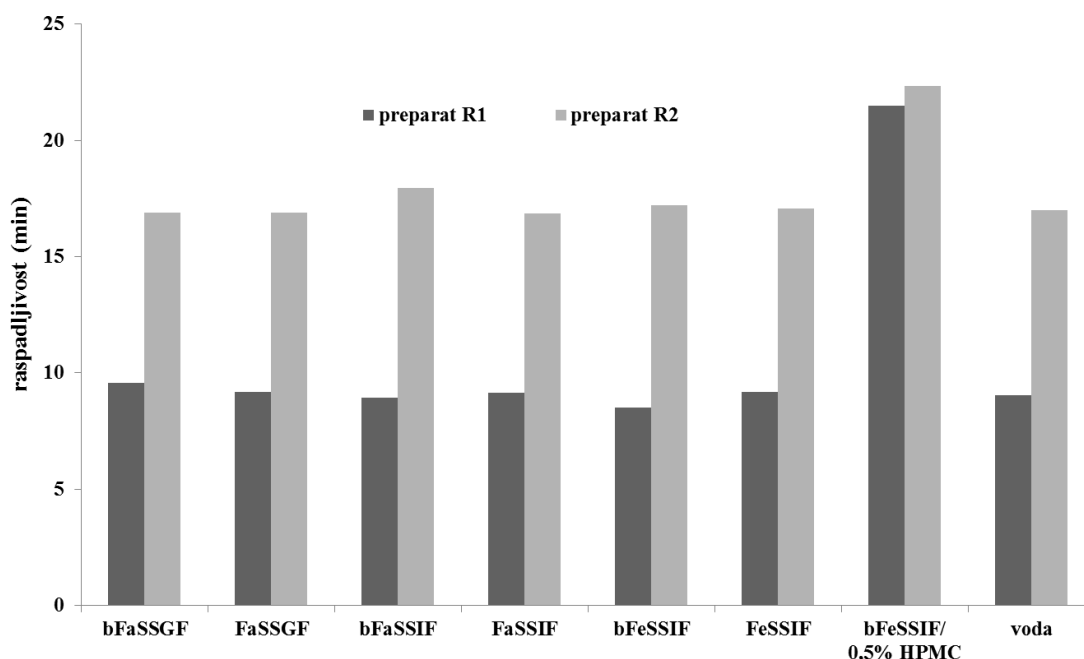
*In vivo* input profili dobijeni Loo-Riegelman metodom i numeričkom dekonvolucijom na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene kao težinske funkcije prikazani su na slici 95.

#### 4.8.4 *In vitro* ispitivanja

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz komercijalno dostupnih film tableta R1 i R2 (kvalitativni sastav tableta naveden je u Prilogu 1; uzorak R1 predstavljale su originatorski proizvod i označene su u daljem tekstu kao referentni preparat) sprovedeno je u cilju razmatranja uticaja različitih eksperimentalnih uslova: vrste i sastava medijuma, kao i tipa aparature na kinetiku rastvaranja ranitidin-hidrohlorida. Kao medijumi za ispitivanje korišćeni su: voda, viskozni medijum (0,5% HPMC u bFeSSIF), kao i fiziološki zasnovani medijumi sa i bez fizioloških surfaktanata. Ispitivanje brzine rastvaranja iz komercijalno dostupnih tableta sprovedeno je u aparaturi sa lopaticom (aparatura 2), i aparaturi sa protočnom ćelijom (aparatura 4). Ispitivanje raspadljivosti sprovedeno je u cilju ispitivanja uticaja različitih medijuma na raspadljivost ispitivanih uzoraka tableta i procenu u kojoj meri farmaceutsko-tehnološke karakteristike preparata utiču na brzinu rastvaranja lekovite supstance.

#### Raspadljivost tableta

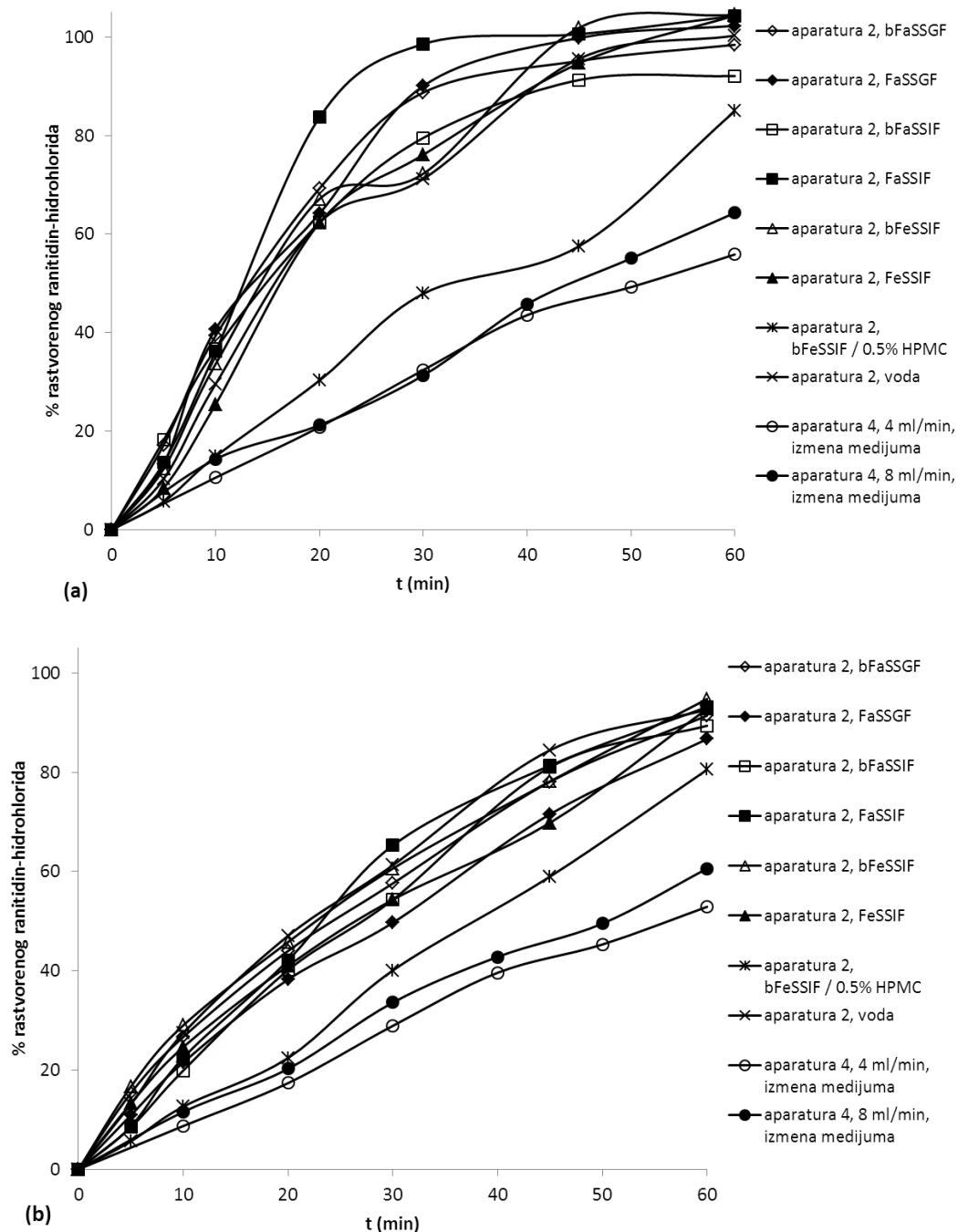
Raspadljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem ranitidin-hidrohlorida (preparati R1 i R2) u različitim medijumima prikazana je na slici 96. Može se uočiti da se preparat R1 relativno brzo raspada (za oko 10 min) izuzev u viskoznom medijumu gde je zabeleženo nešto duže vreme raspadanja (22 min). Preparat R2 u poređenju sa preparatom R1 pokazuje nešto sporije raspadanje (u proseku za oko 17 min) izuzev u viskoznom medijumu gde je vreme raspadanja produženo (oko 22 min) i poklapa se sa vremenom raspadanja referentnog preparata.



Slika 96. Raspadljivost film tableta ranitidin-hidrohlorida (preparati R1 i R2) u različitim medijumima

## Brzina rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz tableta

Ekperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz ispitivanih film tableta prikazani su na slici 97a za preparat R1, odnosno 97b za preparat R2.



Slika 97. Profili brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida: preparat R1 (a) i preparat R2 (b)

Dobijeni rezultati ukazuju na izvesne razlike u profilu rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz ispitivanih uzoraka tableta, pri čemu je celokupna količina lekovite supstance rastvorena nakon 45 minuta, odnosno 60 minuta, u slučaju preparata R1 i preparata R2, redom. Dodatak HPMC kao sredstva za povećanje viskoziteta doveo je do sporijeg rastvaranja lekovite supstance. Ovakvi rezultati u skladu su sa razlikama uočnim u okviru ispitivanja raspadljivosti tableta.

Brzina rastvaranja lekovite supstance u aparaturi tipa protočne ćelije bila je nešto sporija u odnosu na rezultate dobijene u aparaturi sa lopaticom s obzirom da je nakon 60 minuta rastvoreno 50-60% ranitidin-hidrohlorida, pri čemu su razlike između preparata R1 i R2 bile manje izražene. Brzina protoka medijuma nije značajno uticala na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanih preparata.

Zanimljivo je da nijedan od zabeleženih profila brzine rastvaranja za oba ispitivana preparata nije u skladu sa kriterijumima „veoma brzog rastvaranja“ (tj. više od 85% za 15 min), koji bi bio potreban za izostavljanje studija biološke ekvivalencije u slučaju lekova BCS klase 3.

## 4.8.5 *In silico* ispitivanja

U okviru ovog poglavlja biće opisana GI simulacija apsorpcije ranitidina iz film tableta korišćenjem programskih paketa Simcyp® i GastroPlus™, u cilju mehanističke interpretacije apsorpcije ranitidina, razjašnjenja fenomena dvostrukog pika, identifikacije biorelevantne metode za ispitivanje brzine rastvaranja i postavljanja klinički relevantnih specifikacija.

### 4.8.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa

#### Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije ranitidina iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa *Simcyp® Population - Based Simulator* (verzija 13.2, Certara™, SAD). Simulacija apsorpcije sprovedena je korišćenjem fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 73, čije su vrednosti preuzete iz literature ili su *in silico* predviđene. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. Validacija modela sprovedena je na osnovu srednjeg profila koncentracije ranitidina u plazmi iz studije Sadray i sar. (2003).

Apsorpcija ranitidina iz GI trakta simulirana je korišćenjem ADAM modela. U simulacijama je korišćen podatak o efektivnoj permeabilnosti ranitidina u jejunumu iz studije Takamatsu i sar. (2001), dok su vrednosti efektivne permeabilnosti u duodenumu, ileumu i kolonu optimizovane korišćenjem *Simcyp® Parameter Estimation* opcije i iznose  $3,0 \cdot 10^{-4}$  cm/s,  $3,0 \cdot 10^{-4}$  cm/s i  $0,1 \cdot 10^{-4}$  cm/s, respektivno. S obzirom da brojna istraživanja ukazuju da je ranitidin supstrat za P-glikoprotein (Collet i sar, 1999; Yazdanian i sar, 2004; Lentz i sar, 2000), ovaj podatak uključen je u simulaciju procesa apsorpcije. Vrednost Michaelis-Menten-ove konstante, ( $K_m=6,69 \cdot 10^4$  μM) preuzeta je iz istraživanja Lee i sar. (2002), vrednost maksimalnog fluksa ( $J_{max}=3 \cdot 10^5$  pmol/min) je optimizovana korišćenjem *Simcyp® Parameter Estimation* opcije, dok je za podatak o regionalnoj zastupljenosti transportera usvojena *Simcyp®* osnovna vrednost. Što se tiče rastvorljivosti, korišćena je vrednost od 500 mg/ml s obzirom da je to maksimalna vrednost koja se može uneti za ovaj parametar. Iako literaturni podaci ukazuju da je rastvorljivost ranitidin-hidrohlorida nešto viša (Martindale, 2020) obe vrednosti su daleko iznad granične vrednosti rastvorljivosti, pa se ne očekuje da će ovo odstupanje uticati na rezultate simulacija. Volumen distribucije predviđen je u *Simcyp®*-u na osnovu potpunog PBPK modela distribucije i metode Rodgers i Rowland (metoda 2) i iznosi 1,7467 L/kg što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Garg i sar, 1981; Van Hecken i sar, 1982; Mc Neil i sar, 1981; Lebert i sar, 1981). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

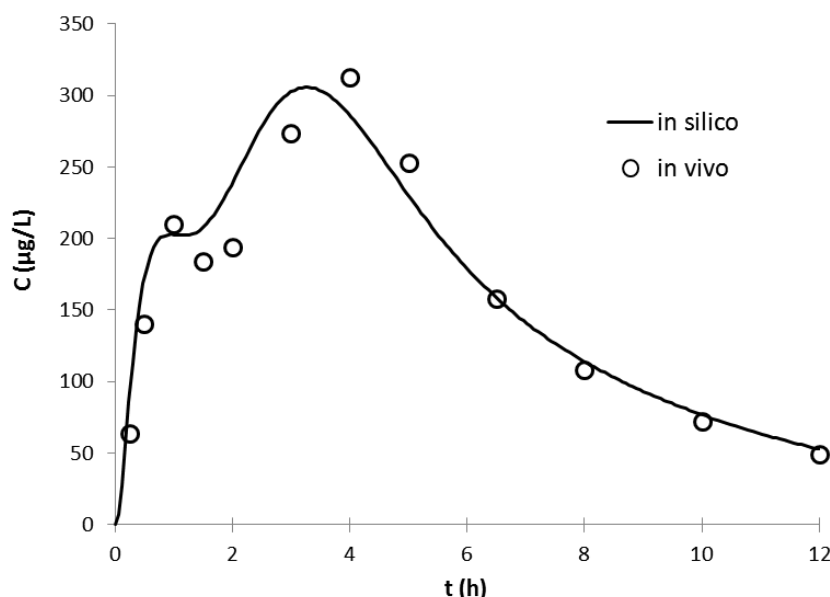
Tabela 73. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije ranitidina

<b>Parametar</b> (jedinica mere)	<b>Vrednost</b>
Molekulska masa (g/mol)	314,4
$\log P_{o:w}$	1,28 <sup>a</sup>
Jednokiselna baza	
pKa	8,2 <sup>b</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>c</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, $f_u$	0,85 <sup>c</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, $P_{eff}$ (cm/s)	$0,27 \cdot 10^{-4}$ <sup>d</sup>
Transport, efluks: ABCB1 (P-gp)	
$K_m$ ( $\mu$ M)	$6,69 \cdot 10^4$ <sup>e</sup>
$J_{max}$ (pmol/min)	$3,0 \cdot 10^5$ <sup>f</sup>
Rastvorljivost (mg/ml)	500 <sup>d</sup>
Konstanta precipitacije ( $h^{-1}$ )	4 <sup>g</sup>
Radius čestica lekovite supstance ( $\mu$ m)	10 <sup>g</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>g</sup>
Distribucija	
Potpuni PBPK model, metoda 2	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, $V_{ss}$ (L/kg)	1,7467 <sup>h</sup>
Eliminacija	
$CL_{iv}$ (L/h)	42,54 <sup>i</sup>
$CL_R$ (L/h)	29,34 <sup>i</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	150
Vreme simulacije (h)	12
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250

<sup>a</sup> Podatak iz literature (Martindale, 2020); <sup>b</sup> Podatak iz literature (Carey i sar, 1981); <sup>c</sup> Podatak iz literature (Garg i sar, 1981); <sup>d</sup> Objasnjeno u tekstu <sup>e</sup> Podatak iz literature (Lee i sar, 2002); <sup>f</sup> Vrednost optimizovana korišćenjem Simcyp® Parameter Estimation opcije; <sup>g</sup> Simcyp® osnovna vrednost; <sup>h</sup> Vrednost izračunata u Simcyp®-u korišćenjem potpunog PBPK modela distribucije; <sup>i</sup> Podatak iz literature (Mc Neil i sar, 1981)

Simulirani profil koncentracije ranitidina u plazmi na osnovu ulaznih parametara prikazanih u tabeli 74 u saglasnosti je sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Sadray i sar, 2003) što je prikazano na slici 98. Može se zapaziti odlično slaganje simuliranog i *in vivo* dobijenog profila ranitidina u plazmi gde je gastrointestinalnom simulacijom takođe predviđena pojava dvostrukog pika.

Tačnost predviđanja procenjena je izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), prikazanih u tabeli 74, i s obzirom da njihove vrednosti ne prelaze 10%, model se smatra validiranim i kao takav korišćen je za dalja ispitivanja.



Slika 98. Simulirani profil koncentracije ranitidina u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na *in vivo*

Tabela 74. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih greški predviđanja za tablete sa trenutnim oslobađanjem ranitidina

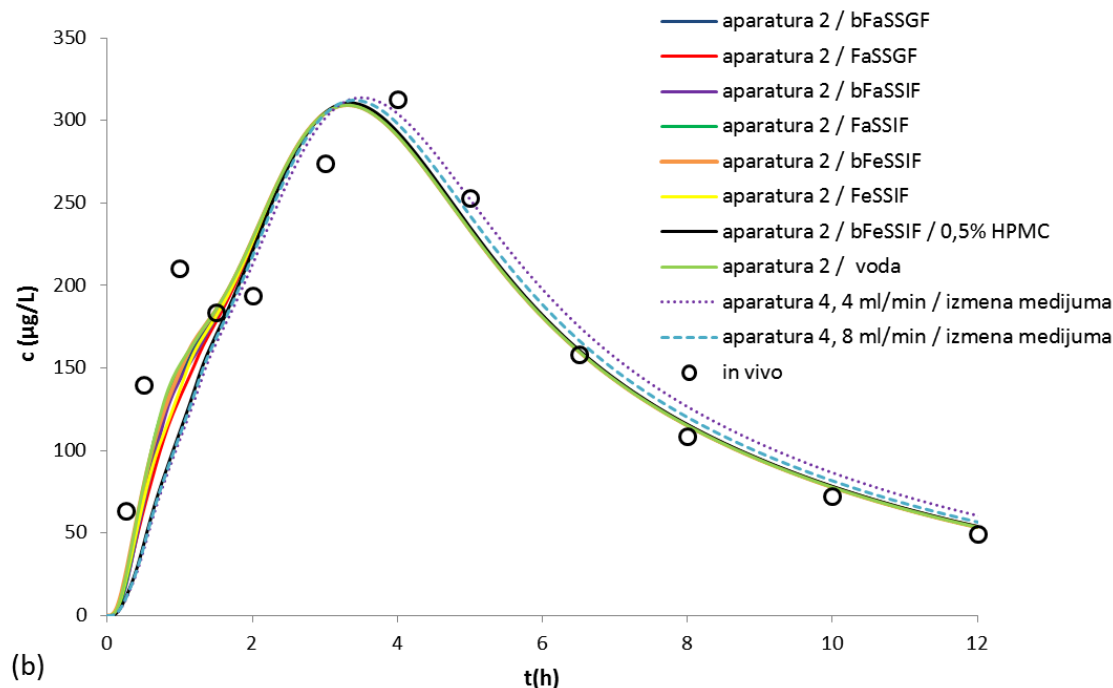
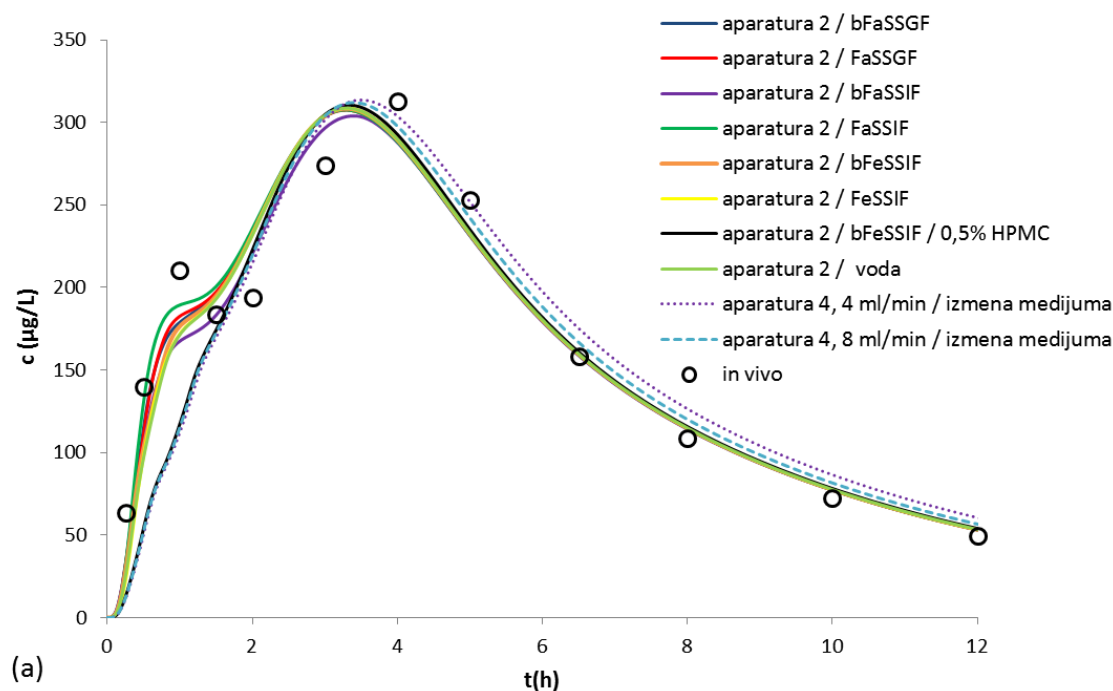
Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{max1}$ (µg/L)	210,60	210,20	0,19
$C_{max2}$ (µg/L)	312,56	305,70	2,19
$t_{max1}$ (h)	1,00	1,00	0,00
$t_{max2}$ (h)	4,00	3,60	10,00
$PIK_{0-t}$ (µgh/L)	1.998,30	1.993,60	0,23

### Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Da bi se ispitao uticaj brzine rastvaranja na profil koncentracije ranitidina u plazmi u funkciji vremena, eksperimentalno dobijeni *in vitro* profili brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz film tableta korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije. Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 99a za preparat R1, odnosno 99b za preparat R2.

Simulirani profili prikazani na slici 99 ukazuju da *in vitro* profil brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz film tableta nema značajnog uticaja na rezultate GI simulacije ukoliko je rastvaranje ranitidin-hidrohlorida potpuno u toku 1 h, s tim što se može zabeležiti da je sporija kinetika rastvaranja u slučaju preparata R2 uslovlila izostajanje prvog pika. Sporije rastvaranje ranitidin-hidrohlorida zabeleženo u viskoznom medijumu i aparaturi sa protočnom ćelijom kod oba ispitivana preparata takođe je uslovlilo izostanak prvog pika u profilu koncentracije leka u plazmi.





Slika 99. Simulirani profili koncentracije ranitidina u plazmi na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz film tableta zajedno sa *in vivo* uočenim profilom za: (a) preparat R1 i (b) preparat R2

Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), dobijenih na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ranitidin-hidroklorida iz film tableta, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 75. Prikazani rezultati ukazuju da je najbolje slaganje simuliranog i stvarnog profila koncentracije ranitidina u plazmi dobijeno kada su kao ulazni podaci za simulacije korišćeni eksperimentalno određeni profili brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom u svim medijumima izuzev viskoznog.

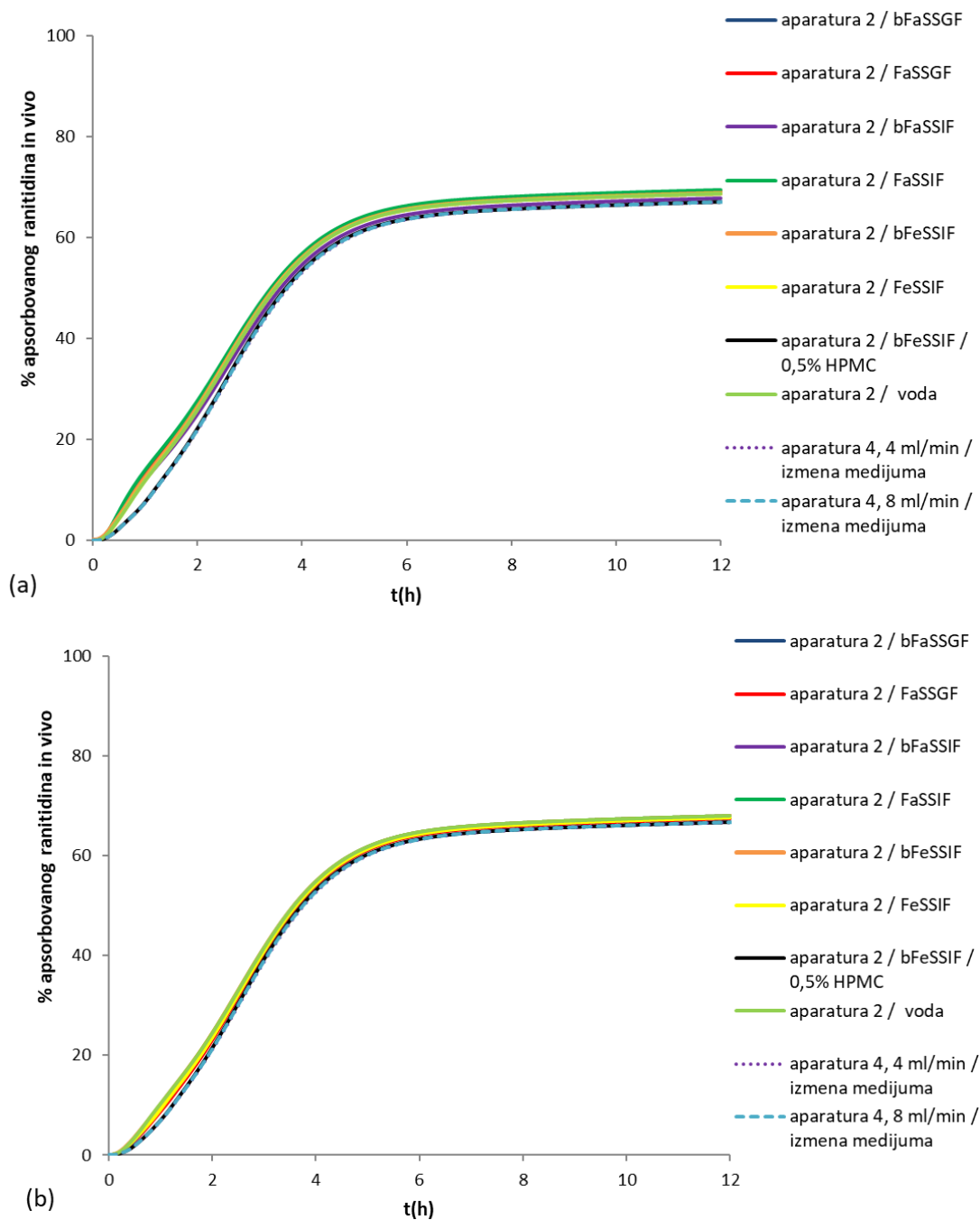
Tabela 75. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz film tableta, kao i odgovarajuće greške predviđanja

<b><i>In vitro</i> profil</b>		$C_{max1}$	%PE	$C_{max2}$	%PE	$t_{max1}$	%PE	$t_{max2}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu\text{g/L}$ )		( $\mu\text{g/L}$ )		(h)		(h)		( $\mu\text{gh/L}$ )	
<b>Preparat R1</b>											
Aparatura 2	bFaSSGF	171,2	18,7	308,5	1,29	0,84	16,00	3,3	17,50	1950,0	2,41
	FaSSGF	178,1	15,43	307,4	1,65	0,90	10,00	3,3	17,50	1947,1	2,56
	bFaSSIF	166,3	21,03	303,9	2,77	0,96	4,00	3,4	15,00	1910,3	4,40
	FaSSIF	187,2	11,11	307,5	1,61	0,84	16,00	3,3	17,50	1961,1	1,86
	bFeSSIF	177,1	15,90	308,3	1,36	1,02	2,00	3,3	17,50	1941,7	2,83
	FeSSIF	173,4	17,66	308,7	1,23	1,02	2,00	3,3	17,50	1937,3	3,05
	bFeSSIF/0,5% HPMC	/	/	310,4	0,69	/	/	3,4	15,00	1885,4	5,64
	voda	173,1	17,80	308,6	1,26	1,02	2,00	3,3	17,50	1936,4	3,09
Aparatura 4	4 ml/min	/	/	315,5	0,94	/	/	3,8	5,00	1853,2	7,26
	8 ml/min	/	/	312,4	0,05	/	/	3,6	10,00	1872,6	6,29
<b>Preparat R2</b>											
Aparatura 2	bFaSSGF	/	/	309,5	0,97	/	/	3,3	17,50	1911,2	4,35
	FaSSGF	/	/	309,8	0,88	/	/	3,3	17,50	1897,4	5,04
	bFaSSIF	/	/	309,6	0,94	/	/	3,3	17,50	1904,7	4,68
	FaSSIF	/	/	309,5	0,97	/	/	3,3	17,50	1914,8	4,17
	bFeSSIF	/	/	309,4	1,01	/	/	3,3	17,50	1915,6	4,13
	FeSSIF	/	/	309,7	0,91	/	/	3,3	17,50	1904,4	4,69
	bFeSSIF/0,5% HPMC	/	/	310,7	0,59	/	/	3,4	15,00	1875,4	6,15
	Voda	/	/	309,3	1,04	/	/	3,3	17,50	1916,9	4,07
Aparatura 4	4 ml/min	/	/	315,6	0,97	/	/	3,7	7,50	1863,2	6,76
	8 ml/min	/	/	312,3	0,08	/	/	3,5	12,50	1869,1	6,46
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>210,6</b>		<b>312,56</b>		<b>1,0</b>		<b>4,0</b>		<b>1998,3</b>	

### Identifikacija profila apsorpcije ranitidina primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija apsorpcije ranitidina iz film tableta sprovedena je korišćenjem validiranog modela GI simulacije. Cilj ovih ispitivanja bio je da se proceni mogućnost primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila, kao i za uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa.

*In silico* profili apsorpcije ranitidina iz film tableta dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 100a za preparat R1, odnosno 100b za preparat R2. Može se uočiti da se apsorpcija ranitidina odvija relativno brzo (u prvih 5 h ispitivanja), kao i da brzina rastvaranja lekovite supstance određena *in vitro* nema značajnog uticaja na obim i brzinu apsorpcije. Predviđeni obim apsorpcije od oko 65% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti ranitidina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.



Slika 100. Hipotetički profili apsorpcije ranitidina simulirani na osnovu profila brzine rastvaranja lekovite supstance iz film tableta: (a) preparat R1 i (b) preparat R2

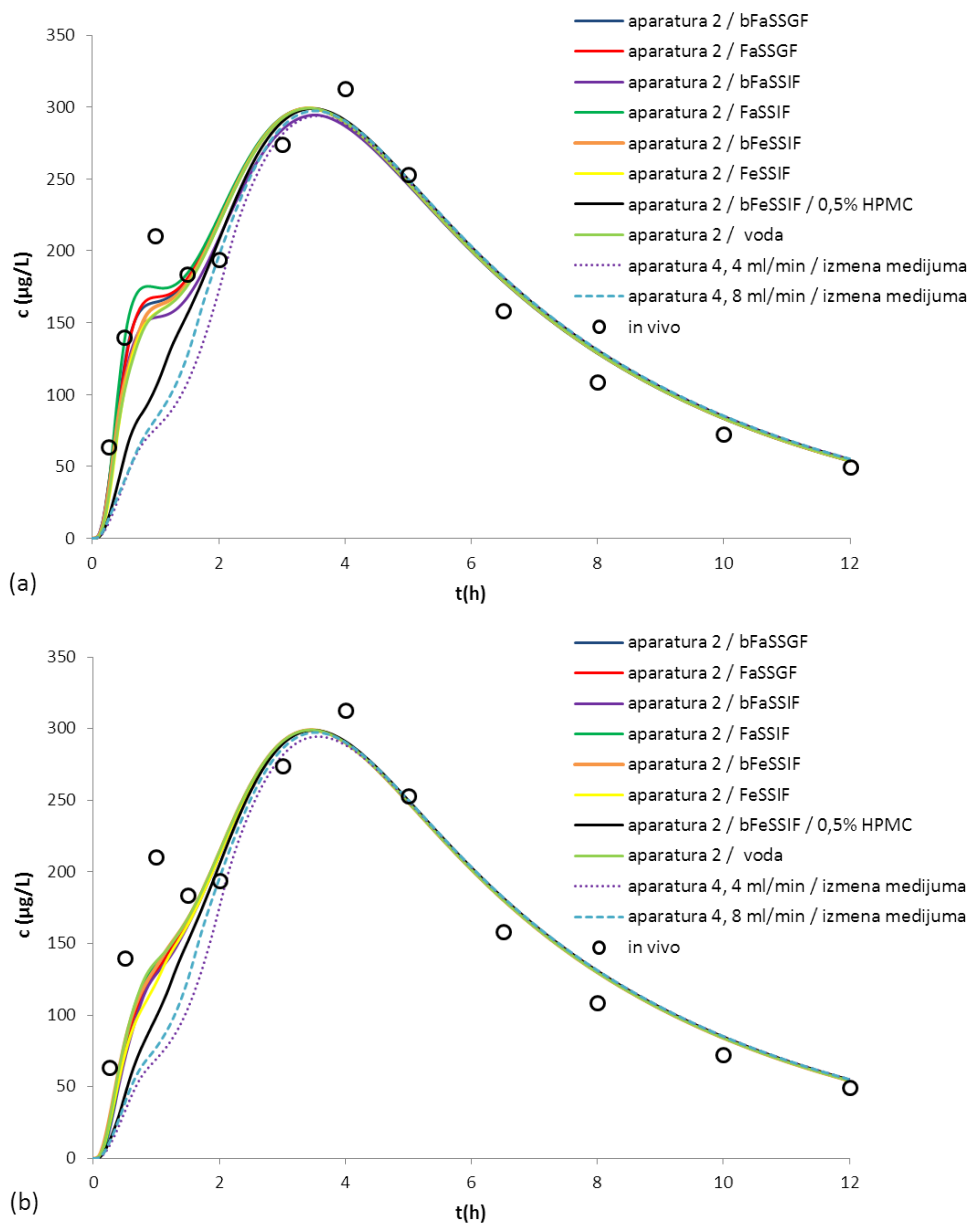
#### 4.8.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja korišćene su iste vrednosti ulaznih parametara (prikazane u tabeli 73) u okviru GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) programskog paketa. Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija, izuzev ASF faktora koji su optimizovani i dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 76. Vrednost Michaelis-Menten-ove konstante, ( $K_m=6,69 \cdot 10^4 \mu\text{M}$ ) preuzeta je iz istraživanja Lee i sar. (2002) kao i u slučaju Simcyp®-a, dok je vrednost maksimalne aktivnosti transportera optimizovana i iznosi  $V_{\text{max}}=1900 \text{ mg/s}$ . Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode Rodgers i Rowland, kao i u slučaju

Simcyp<sup>®</sup>-a, i dobijena je vrednost od 1,7708 L/kg što odgovara vrednosti predviđenoj u Simcyp<sup>®</sup>-u gde je predviđen volumen distribucije od 1,7467 L/kg.

Tabela 76. Optimizovane vrednosti ASF faktora za ranitidin

Prostor	Želudac	Duodenum	Jejunum	Jejunum	Ileum	Ileum	Ileum	Cekum	Ascendentni kolon
ASF	0	18	5,1	0,001	0,001	0,001	80	7,7	0,001



Slika 101. Profili koncentracije ranitidina u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus<sup>™</sup> programskog paketa na osnovu profila brzine rastvaranja iz film tableta, zajedno sa *in vivo* uočenim profilom za: (a) preparat R1 i (b) preparat R2

Plazma profili koncentracije ranitidina u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus<sup>™</sup> programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz tableta sa trenutnim oslobađanjem zajedno sa *in vivo* uočenim profilom prikazani su na slici 101a za preparat R1, odnosno slici 101b za preparat R2, dok su odgovarajuće greške predviđanja relevantnih farmakokinetičkih parametara date u tabeli 77.

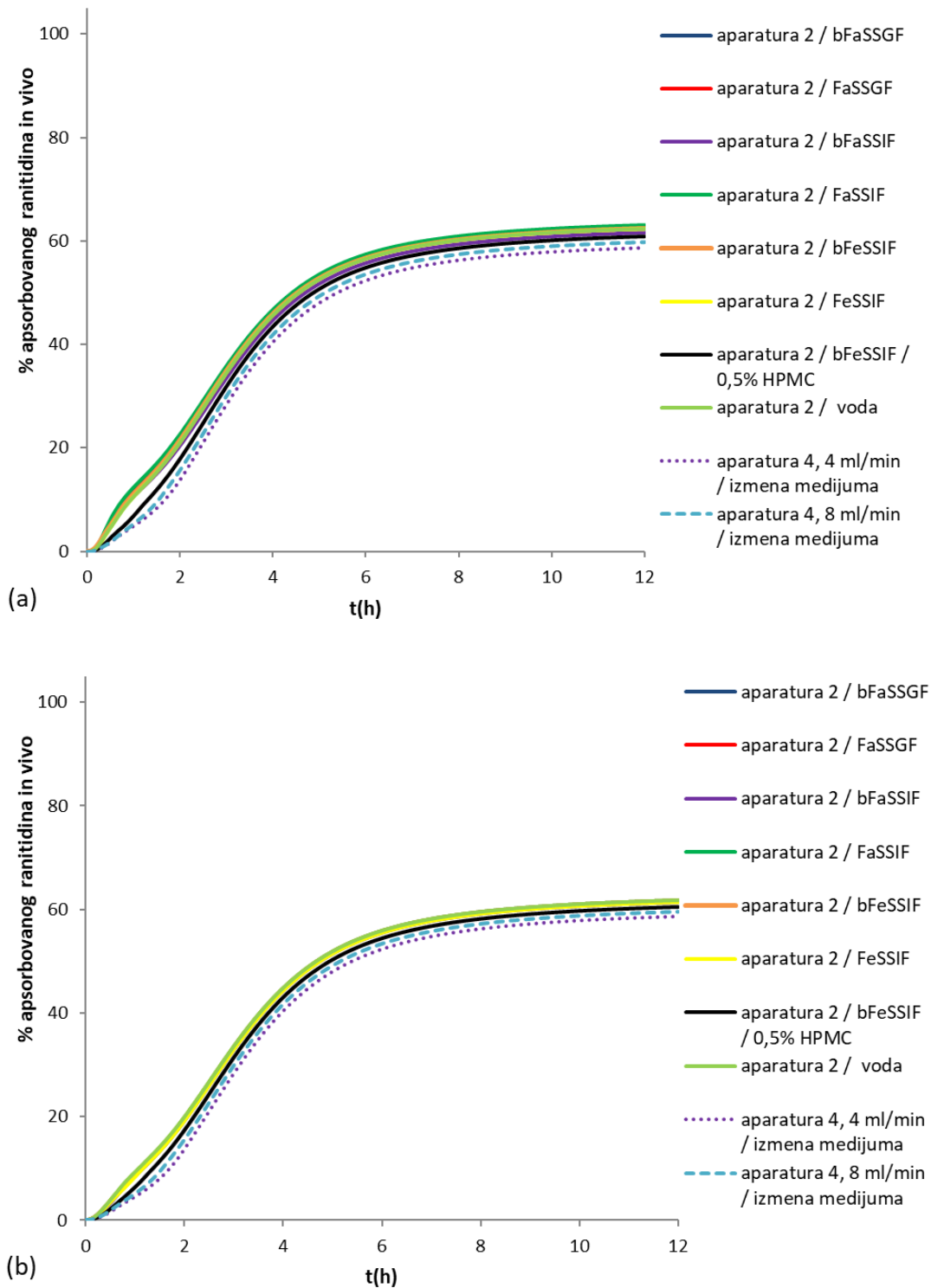
Može se uočiti da se i GI simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa pokazala uspešnom u predviđanju profila koncentracije ranitidina u plazmi, te da su dobijene relativno niske vrednosti greški predviđanja za  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ . Prikazani rezultati takođe ukazuju da je najbolje slaganje simuliranog i stvarnog profila koncentracije ranitidina u plazmi dobijeno kada su kao ulazni podaci za simulacije korišćeni eksperimentalno određeni profili brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom u svim medijumima izuzev viskoznog, odnosno kada je nakon 1 h ispitivanja zabeleženo potpuno rastvaranje ranitidin-hidrohlorida.

Tabela 77. Farmakokinetički parametri predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu profila brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz film tableta, kao i odgovarajuće greške predviđanja

<b><i>In vitro</i> profil</b>		$C_{max1}$	%PE	$C_{max2}$	%PE	$t_{max1}$	%PE	$t_{max2}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu$ g/L)		( $\mu$ g/L)		(h)		(h)		( $\mu$ gh/L)	
<b>Preparat R1</b>											
Aparatura 2	bFaSSGF	164,2	22,03	299,1	4,30	0,87	13,00	3,5	12,50	1997,0	0,06
	FaSSGF	170,1	19,23	299,3	4,24	0,90	10,00	3,5	12,50	1997,1	0,06
	bFaSSIF	153,1	27,30	294,1	5,90	0,86	14,00	3,5	12,50	1962,3	1,80
	FaSSIF	180,7	14,19	299,5	4,17	0,93	7,00	3,4	15,00	2010,1	0,59
	bFeSSIF	162,3	22,93	299,4	4,21	0,97	3,00	3,5	12,50	1992,7	0,28
	FeSSIF	154,3	26,73	299,7	4,11	0,91	9,00	3,5	12,50	1987,1	0,56
	bFeSSIF/0,5% HPMC	/	/	298,3	4,56	/	/	3,5	12,50	1932,0	3,31
	voda	158,2	24,88	299,1	4,30	1,00	0,00	3,5	12,50	1983,4	0,74
	Aparatura 4	4 ml/min	/	/	293,1	6,22	/	/	3,6	10,0	1851,5
8 ml/min		/	/	297,3	4,88	/	/	3,6	10,0	1892,1	5,31
<b>Preparat R2</b>											
Aparatura 2	bFaSSGF	/	/	299,1	4,30	/	/	3,5	12,50	1963,2	1,75
	FaSSGF	/	/	298,8	4,40	/	/	3,5	12,50	1942,6	2,78
	bFaSSIF	/	/	299,1	4,30	/	/	3,5	12,50	1954,3	2,20
	FaSSIF	/	/	299,6	4,14	/	/	3,4	15,00	1964,3	1,70
	bFeSSIF	/	/	299,1	4,30	/	/	3,4	15,00	1965,7	1,63
	FeSSIF	/	/	299,2	4,27	/	/	3,5	12,50	1953,4	2,24
	bFeSSIF/0,5% HPMC	/	/	299,7	4,11	/	/	3,5	12,50	1925,4	3,64
	voda	/	/	299,1	4,30	/	/	3,4	15,00	1966,3	1,60
Aparatura 4	4 ml/min	/	/	294,3	5,84	/	/	3,6	10,00	1853,1	7,26
	8 ml/min	/	/	297,3	4,88	/	/	3,5	12,50	1889,2	5,45
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>210,6</b>		<b>312,56</b>		<b>1,0</b>		<b>4,0</b>		<b>1998,3</b>	

### Identifikacija profila apsorpcije ranitidina primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

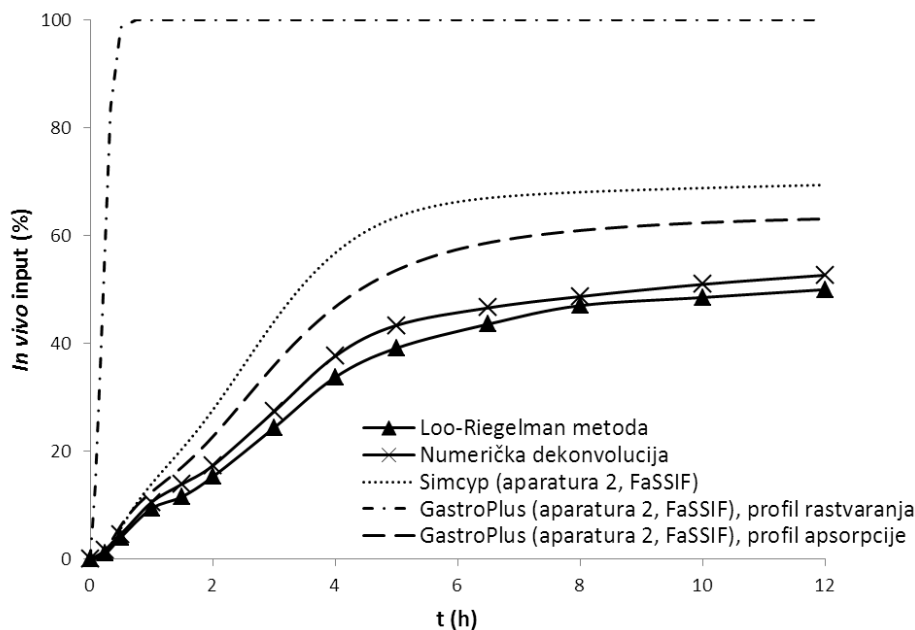
Hipotetički profili apsorpcije ranitidina iz film tableta dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u prikazani su na slici 102a za preparat R1, odnosno slici 102b za preparat R2. Prikazani rezultati ukazuju na ograničenu apsorpciju ranitidina koja se primarno dešava u tankom crevu. Predviđeni obim apsorpcije u saglasnosti je sa literaturnim *in vivo* podacima.



Slika 102. Hipotetički *in vivo* profili apsorpcije ranitidina za tablete sa trenutnim oslobađanjem ranitidin-hidrohlorida (a) preparata R1 i (b) preparata R2 dobijeni gastrointestinalnom simulacijom u GastroPlus™-u

Mogu se uočiti značajne razlike između *in vivo* input profila u zavisnosti od primenjene metode dekonvolucije (slika 103) naročito u obimu apsorpcije koji predviđaju, dok se kinetika apsorpcije čini identičnom. Naime, primenom Loo-Riegelman metode i numeričke dekonvolucije predviđeno je oko 50% apsorbovanog leka nakon 6 h, dok se primenom GI simulacije predviđa nešto viši obim apsorpcije (oko 60%) koji je u boljoj saglasnosti sa *in vivo*

podacima. Poređenjem profila rastvaranja i profila apsorpcije dobijenog GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™-a može se uočiti da se apsorpcija značajno sporije odvija što je u saglasnosti sa niskom permeabilnošću ispitivane model supstance.



Slika 103. Uporedni pregled *in vivo* input profila ranitidina dobijenih primenom različitih metoda dekonvolucije za film tablete (preparat R1)

#### 4.8.6 *In vitro-in vivo* korelacija

##### Dekonvolucionni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati primenom različitih metoda analizirani su u odnosu na *in vitro* profile brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz ispitivanih preparata pod različitim eksperimentalnim uslovima.

S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale (TS). Hipotetički input profili dobijeni korišćenjem različitih metoda, kao i eksperimentalni profili brzine rastvaranja za film tablete analizirani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Faktori skaliranja vremenske ose izračunati su kao odnos  $\tau_{divivo}$  i  $\tau_{divitro}$  (tabela 78). Može se uočiti da se vrednosti faktora TS značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene metode, kao i *in vitro* profila brzine rastvaranja i kreću se u opsegu 2,90 do 15,44 za preparat R1, odnosno 3,51 do 8,21 za preparat R2.

Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom za preparate R1 i R2 nakon korekcije vremenske ose prikazani su u tabeli 79. Visok nivo korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka dobijen je za *in vitro* profile brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom i aparaturi sa protočnom ćelijom za veće brzine protoka medijuma ( $r > 0,95$ ). Relevantne vrednosti nagiba pravca variraju u opsegu 0,4664-0,8954. Ovi rezultati jasno ukazuju da se profil rastvaranja ranitidin-hidrohlorida u aparaturi sa lopaticom i aparaturi sa protočnom ćelijom pri većim brzinama protoka medijuma poklapa sa predviđenim profilima apsorpcije lekovite supstance u organizmu.

Tabela 78. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz film tableta, kao i odgovarajući faktori skaliranja vremenske ose za preparate R1 i R2

<i>In vitro</i> profil		TS					
Uređaj	Medijum/protok	$\tau_a$ (h)	$\beta$	Loo-Riegelman metoda	Numerička dekolucija	Simcyp <sup>®</sup> simulacija	GastroPlus <sup>™</sup> simulacija
<b>Preparat R1</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	0,28	1,34	13,78	12,64	10,17	11,60
	FaSSGF	0,31	1,35	12,45	11,41	9,19	10,48
	bFaSSIF	0,27	1,20	14,29	13,11	10,55	12,03
	FaSSIF	0,25	1,85	15,44	14,16	11,40	13,00
	bFeSSIF	0,34	1,33	11,35	10,41	8,38	9,55
	FeSSIF	0,38	1,45	10,15	9,31	7,50	8,55
	bFeSSIF /0,5% HPMC	0,77	1,29	5,01	4,59	3,70	4,22
	voda	0,38	1,30	10,15	9,31	7,50	8,55
Aparatura 4	4ml/min	0,42	1,01	9,19	8,42	6,78	7,73
	8ml/min	0,98	0,82	3,93	3,61	2,90	3,31
<b>Preparat R2</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	0,75	0,96	5,14	4,72	3,80	4,33
	FaSSGF	0,66	1,14	5,84	5,36	4,31	4,92
	bFaSSIF	0,55	1,34	7,01	6,43	5,18	5,90
	FaSSIF	0,51	1,30	7,56	6,94	5,58	6,37
	bFeSSIF	0,55	1,02	7,01	6,43	5,18	5,90
	FeSSIF	0,65	1,08	5,93	5,44	4,38	5,00
	bFeSSIF /0,5% HPMC	0,81	1,49	4,76	4,37	3,51	4,01
	voda	0,58	1,07	6,65	6,10	4,91	5,60
Aparatura 4	4ml/min	0,47	1,05	8,21	7,53	6,06	6,91
	8ml/min	0,70	0,87	5,51	5,05	4,07	4,64



Tabela 79. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparate R1 i R2 (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro input/ in vivo input</i>		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uređaj	Medijum/protok					
<b>Preparat R1</b>						
Aparatura 2	bFaSSGF	a	0,5205	0,5370	0,7208	0,6459
		r	0,9982	0,9977	0,9982	0,9985
	FaSSGF	a	0,4905	0,5062	0,6969	0,6158
		r	0,9951	0,9951	0,9973	0,9967
	bFaSSIF	a	0,5710	0,5860	0,7856	0,7049
		r	0,9961	0,9954	0,9958	0,9967
	FaSSIF	a	0,4667	0,4832	0,6607	0,5820
		r	0,9965	0,9966	0,9976	0,9964
	bFeSSIF	a	0,4996	0,4992	0,7024	0,6240
		r	0,9945	0,9905	0,9934	0,9936
	FeSSIF	a	0,4845	0,5012	0,6877	0,6045
		r	0,9972	0,9955	0,9948	0,9965
	bFeSSIF/0,5% HPMC	a	0,4755	0,4934	0,6769	0,5954
		r	0,9945	0,9947	0,9956	0,9941
voda	a	0,4913	0,5149	0,7017	0,6195	
	r	0,9948	0,9934	0,9959	0,9951	
Aparatura 4	4 ml/min	a	0,8016	0,7844	0,8954	0,8868
		r	0,9703	0,9638	0,9362	0,9555
	8 ml/min	a	0,4788	0,5042	0,6884	0,6104
		r	0,9958	0,9965	0,9977	0,9981
<b>Preparat R2</b>						
Aparatura 2	bFaSSGF	a	0,5020	0,5255	0,7259	0,6368
		r	0,9878	0,9877	0,9876	0,9873
	FaSSGF	a	0,5017	0,4805	0,7117	0,6302
		r	0,9966	0,9324	0,9985	0,9983
	bFaSSIF	a	0,5011	0,5450	0,7021	0,6235
		r	0,9980	0,9645	0,9991	0,9985
	FaSSIF	a	0,4983	0,4619	0,6930	0,6212
		r	0,9986	0,9393	0,9984	0,9984
	bFeSSIF	a	0,5188	0,4971	0,7370	0,6504
		r	0,9944	0,9721	0,9966	0,9964
	FeSSIF	a	0,5014	0,4797	0,7172	0,6361
		r	0,9928	0,9599	0,9963	0,9967
	bFeSSIF/0,5% HPMC	a	0,4664	0,4848	0,6651	0,5729
		r	0,9962	0,9928	0,9966	0,9948
voda	a	0,5048	0,4964	0,7227	0,6372	
	r	0,9951	0,9749	0,9960	0,9959	
Aparatura 4	4 ml/min	a	0,7430	0,7243	0,7850	0,7963
		r	0,9585	0,9361	0,9141	0,9378
	8 ml/min	a	0,5033	0,5205	0,6749	0,6124
		r	0,9741	0,9796	0,9757	0,9762

### Konvolucioni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju IVIVK, profili koncentracije ranitidina u plazmi predviđeni primenom GI simulacije u Simcyp® i GastroPlus™ programskim paketima na osnovu

različitih profila brzine rastvaranja, analizirani su u odnosu na srednji farmakokinetički profil zabeležen u *in vivo* studiji Sadray i sar. (2003). Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 80.

Najviši nivo korelacije, opisan vrednošću koeficijenta korelacije većim od 0,95 i nagibom regresione prave blizu jedinice, dobijen je za *in vitro* profile u aparaturi sa lopaticom za preparat R1. Manje odstupanje od IVIVK zabeleženo je samo u slučaju kada je za simulaciju korišćen profil dobijen u viskoznom medijumu. Ovakav rezultat ukazuje da što je brže rastvaranje *in vitro*, može se očekivati bolja IVIVK za lekove koji pripadaju BCS klasi 3, kao što je ranitidin-hidrohlorid.

Ovi rezultati govore u prilog činjenici da će apsorpcija lekova BCS klase 3, kao što je ranitidin-hidrohlorid, ukoliko je rastvaranje brzo, zavisiti od permeabilnosti lekovite supstance.

Tabela 80. Statistički parametri IVIVK za preparate R1 i R2 primenom (konvolucioni pristup)

<i>In vitro</i> profil		Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
Uređaj	Medijum/protok	a	r	a	r
<b>Preparat R1</b>					
Aparatura 2	bFaSSGF	0,9378	0,9708	0,9725	0,9720
	FaSSGF	0,9397	0,9713	0,9698	0,9724
	bFaSSIF	0,9594	0,9707	0,9878	0,9674
	FaSSIF	0,9404	0,9738	0,9756	0,9769
	bFeSSIF	0,9313	0,9679	0,9594	0,9672
	FeSSIF	0,9235	0,9648	0,9459	0,9621
	bFeSSIF/0,5% HPMC	0,8573	0,9236	0,8645	0,9092
	voda	0,9294	0,9657	0,9498	0,9625
Aparatura 4	4 ml/min	0,8374	0,9144	0,8267	0,8653
	8 ml/min	0,8555	0,9240	0,8273	0,8777
<b>Preparat R2</b>					
Aparatura 2	bFaSSGF	0,9025	0,9471	0,9180	0,9399
	FaSSGF	0,8820	0,9352	0,9192	0,9419
	bFaSSIF	0,8799	0,9380	0,9027	0,9340
	FaSSIF	0,8972	0,9486	0,9151	0,9419
	bFeSSIF	0,9049	0,9481	0,9259	0,9441
	FeSSIF	0,8887	0,9404	0,9060	0,9324
	bFeSSIF/0,5% HPMC	0,8405	0,9115	0,8446	0,8979
	voda	0,9085	0,9510	0,9122	0,9390
Aparatura 4	4 ml/min	0,8224	0,9046	0,8060	0,8548
	8 ml/min	0,8354	0,9126	0,8178	0,8718

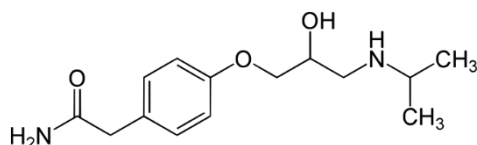
U aparaturi sa lopaticom zabeleženo je za oba ispitivana preparata potpuno rastvaranje ranitidin-hidrohlorida nakon 1 h. Generalno, brzina rastvaranja referentnog preparata je veća u poređenju sa generičkim što se može pripisati sporijoj dezintegraciji generičkog preparata. U aparaturi sa lopaticom uticaj surfaktanata nije zabeležen ni za jedan od ispitivanih preparata. U viskoznoj sredini rastvaranje je usporeno za oba ispitivana preparata. Može se pretpostaviti da je slabo kvašenje u viskoznoj sredini doprinelo uočenom fenomenu.

Gastrointestinalnom simulacijom, na osnovu odabranih fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina ranitidina, dobijen je profil koncentracije lekovite supstance u plazmi koji se dobro slaže sa *in vivo* zabeleženim profilom. Pojava dvostrukog pika koja je zabeležena *in vivo* predviđena je i GI simulacijom i mogla bi se pripisati uticaju aktivnog transporta na apsorpciju lekovite supstance. Rezultati simulacija ukazuju da *in vitro* profil brzine rastvaranja ranitidin-hidrohlorida iz tableta sa trenutnim oslobađanjem nema značajnog uticaja na rezultate GI simulacije ukoliko je rastvaranje ranitidin-hidrohlorida potpuno u toku 1h, s tim što se može zabeležiti da sporija kinetika rastvaranja ranitidin-hidrohlorida dovodi do izostajanja ranog pika

u simuliranim profilima. Simulirani profili apsorpcije na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila brzine rastvaranja ukazuju da se apsorpcija ranitidina odvija u tankom crevu, kao i da brzina rastvaranja ranitidin-hidrohlorida određena *in vitro* nema značajnog uticaja na obim i brzinu apsorpcije. Predviđeni obim apsorpcije od oko 65% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti ranitidina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.

Da bi se procenila mogućnost uspostavljanja korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, primenjeni su dekonvolucioni i konvolucioni pristup analizi. Obe metode se potvrdile da je najviši nivo korelacije dobijen za *in vitro* profile dobijene u aparaturi sa lopaticom u slučaju korišćenja svih ispitivanih medijuma izuzev viskoznog.

## 4.9 MODEL SUPSTANCA: ATENOLOL



(RS)-2-{4-[2-hidroksi-3-(propan-2-ilamino)propoksi]fenil}acetamid

Slika 104. Strukturna formula i hemijski naziv atenolola

Atenolol je kardioselektivni  $\beta$ -blokator, široko korišćen u terapiji hipertenzije, angine pektoris, srčanih aritmija i infarkta miokarda. Uobičajna doza za odrasle je 50 do 100 mg 1-2 puta dnevno (Farmakoterapijski vodič, 2022). Detaljan pregled fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i biofarmaceutskih svojstava atenolola prikazan je u okviru odgovarajuće FIP Biowaiver monografije (Vogelpoel i sar, 2004). U Republici Srbiji, atenolol je dostupan u obliku neobloženih tableta u dozi od 100 mg (ALIMS, 2022).

### 4.9.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva atenolola

Atenolol je slaba baza, pKa 9,6, tako da je u fiziološkim uslovima u jonizovanom obliku i njegova rastvorljivost nije pH-zavisna što potvrđuju i literaturni podaci o rastvorljivosti atenolola: 31,3 mg/ml na pH 1,2 (Moneghini i sar, 1998), 30,26 mg/ml na pH 4,6 odnosno 29,64 mg/ml na pH 6,8 (Cvijić i sar, 2014). U skladu sa ovim podacima, Dozni broj atenolola je oko 0,015, na osnovu čega se ova supstanca karakteriše kao visoko rastvorljiva. Dodatak 1,4 % HPMC-a kao sredstva za povećanje viskozita ne utiče značajno na rastvorljivost atenolola (Cvijić i sar, 2014). Rastvorljivost atenolola u humanom intestinalnom sadržaju u stanju gladovanja iznosi 30,05 mg/ml (Heikkilä i sar, 2011) te se može zaključiti da fiziološki surfaktanti nemaju značajnog uticaja na rastvorljivost atenolola.

Atenolol se nakon oralne primene nepotpuno apsorbuje što ukazuje na nisku permeabilnost atenolola u GI traktu (Vogelpoel i sar, 2004). Prividna permeabilnost određena na Caco-2 ćelijama kreće se u opsegu od  $0,051 \cdot 10^{-6}$  do  $0,57 \cdot 10^{-6}$  cm/s. Masaoka i sar. (2006) su metodom *in situ* perfuzije intestinuma pacova odredili regionalnu permeabilnost atenolola i ona iznosi:  $0,295 \cdot 10^{-4}$  cm/s u jejunumu,  $0,244 \cdot 10^{-4}$  cm/s u ileumu i  $0,207 \cdot 10^{-4}$  cm/s u kolonu. Ovakvi rezultati ukazuju da ne postoje značajne regionalne razlike u permeabilnosti atenolola što nije u saglasnosti sa rezultatima otvorenog perfuzionog modela na ljudima gde je pokazano da atenolol najveću permeabilnost pokazuje u jejunumu ( $0,4 \cdot 10^{-4}$  cm/s), nešto nižu u ileumu ( $0,25 \cdot 10^{-4}$  cm/s) a veoma nisku u kolonu (Lennernäs, 1998; 2014; Tannergren i sar, 2009).

Literaturne vrednosti za apsolutnu biološku raspoloživost kreću se u opsegu 40 - 60% (Fitzgerald, 1979; 1980; Heel i sar, 1979; Kirch i Gorg, 1982). Maksimum koncentracije leka u plazmi postiže se nakon 2 - 4 h. Maksimalne vrednosti koncentracija u plazmi nakon primene 100 mg atenolola u vidu tableta sa trenutnim oslobađanjem kreću se u opsegu 0,49 - 0,85  $\mu$ g/ml (Najib i sar, 2005; Melander i sar, 1979; Shep i sar, 2012; Fitzgerald i sar, 1978). Koncentracija atenolola u plazmi raste proporcionalno primenjenoj dozi leka. Nakon intravenske primene 10% leka izlučuje se preko fecesa dok je ovaj procenat značajno viši i iznosi oko 50% pri oralnoj primeni leka. Ovakvi rezultati ukazuju da ograničena biološka raspoloživost atenolola potiče uglavnom od njegove nepotpune apsorpcije iz GI trakta (Fitzgerald, 1979; 1980; Heel i sar, 1979; Kirch i Gorg, 1982). Uzimanje leka sa hranom uzrokuje značajno niže  $t_{max}$  i smanjenje PIK za oko 20% (Melander i sar, 1979).

Volumen distribucije atenolola kreće se u opsegu 50 – 75 L. Vezivanje za proteine plazme je relativno nisko i kreće se u opsegu 6 – 16% (Kirch i Gorg, 1982).

Atenolol se uglavnom izlučuje urinom u nepromenjenom obliku. U urinu se u veoma malim količinama mogu detektovati glukuronid atenolola i nekonjugovani hidroksi derivat. Atenolol se potpuno eliminiše iz organizma 48 h nakon primene (Melander i sar, 1979). Ukupni klirens atenolola iznosi 100 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, a poluvreme eliminacije 6 – 9 h (Mehvar i sar, 1990).

U biofarmaceutskom smislu, atenolol se opisuje kao lekovita supstanca koja pokazuje visoku rastvorljivost i nisku permeabilnost, na osnovu čega se svrstava u klasu 3 BCS.

#### 4.9.2 *In vivo* podaci

Nakon opsežnog pretraživanja *in vivo* studija dostupnih u literaturi, u cilju biofarmaceutske karakterizacije korišćeni su literaturni profili koncentracija atenolola u plazmi nakon intravenske primene (Wan i sar, 1979), primene oralnog rastvora (Conway i sar, 1976) i oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem (Melander i sar, 1979).

Wan i sar. (1979) poredili su farmakokinetiku atenolola nakon intravenske primene kod zdravih dobrovoljaca i pacijenata sa oboljenjem bubrega. Uočili su da je poluvreme eliminacije atenolola značajno duže kod pacijenata sa oboljenjem bubrega što ukazuje da je renalni put glavni vid eliminacije atenolola. Conway i sar. (1976) ispitivali su farmakokinetiku atenolola nakon primene oralnog rastvora i terapijsku efikasnost kod tahikardije izazvane intravenskom primenom izoprenalina ili intenzivnim vežbanjem i poredili sa delovanjem propranolola. Pokazali su da je atenolol podjednako efikasan kao i propranolol u slučaju tahikardije izazvane intenzivnim vežbanjem, ali značajno manje efikasan u slučaju kada je tahikardija izazvana primenom izoprenalina. Melander i sar. (1979) ispitivali su uticaj hrane na biološku raspoloživost atenolola nakon primene preparata sa trenutnim oslobađanjem i ustanovili da uzimanje hrane dovodi do smanjenja PIK za oko 20%.

Osnovni farmakokinetički parametri uočeni nakon primene izabranih farmaceutskih oblika atenolola prikazani su u tabeli 81.

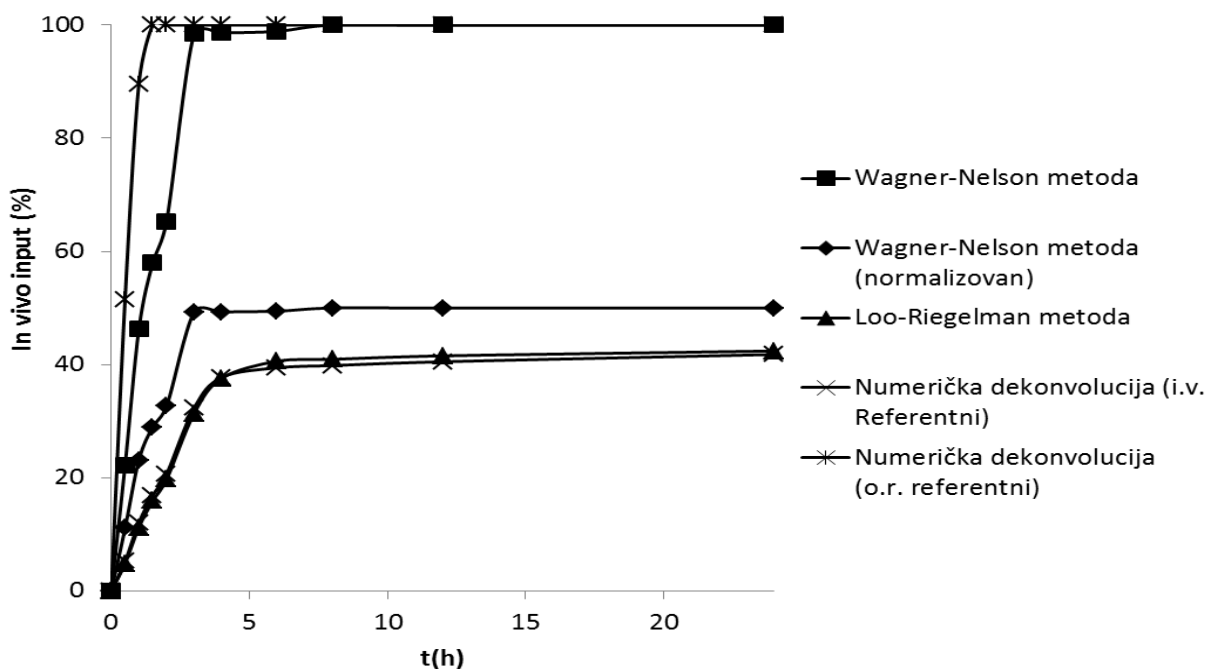
Tabela 81. Farmakokinetički parametri različitih farmaceutskih oblika atenolola

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> (µgh/ml)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	Referenca
i.v. bolus injekcija (50 mg)	2,41	2,63	7,23	/	Wan i sar, 1979
Oralni rastvor (100 mg)	5,96	0,93	9,00	2,00	Conway i sar, 1976
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (100 mg)	6,75	0,78	7,86	3,00	Melander i sar, 1979

#### 4.9.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila atenolola dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

U cilju dobijanja profila brzine rastvaranja i apsorpcije atenolola *in vivo* primenjene su različite metode konvencionalne farmakokinetičke analize: Wagner-Nelson, Loo-Riegelman, numerička dekonvolucija u odnosu na profil dobijen nakon intravenske primene i numerička dekonvolucija u odnosu na profil dobijen nakon primene oralnog rastvora, upotrebom softverskog paketa Kinetica 5.0 i literaturnih profila koncentracija atenolola u plazmi nakon primene analiziranih preparata.

*In vivo* input profili dobijeni primenom različitih dekonvolucionih metoda na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene i primene oralnog rastvora korišćenih kao težinske funkcije, prikazani su na slici 105.



Slika 105. *In vivo* input profili atenolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Melander i sar, 1979) dobijeni primenom različitih farmakokinetičkih metoda

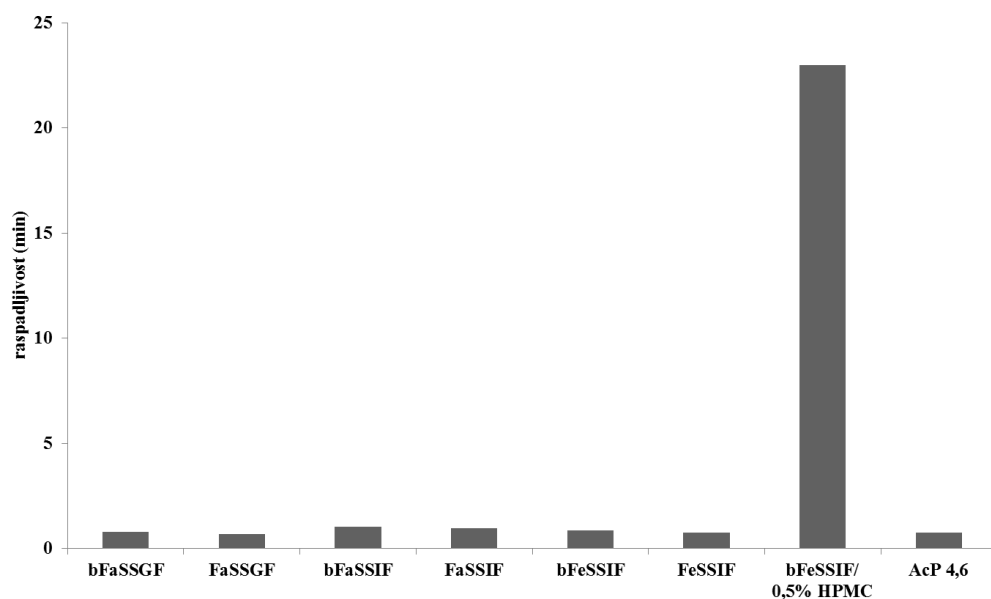
Primenom Wagner-Nelson metode dobijen je profil apsorpcije atenolola koji ukazuje na brzu apsorpciju atenolola i obim apsorpcije od 100% što nije u saglasnosti sa literaturnim podacima o nepotpunoj apsorpciji atenolola iz GI trakta. Da bi se uzela u obzir ograničena apsorpcija atenolola, profil dobijen Wagner-Nelson metodom korigovan je faktorom 0,5, kako bi odgovarao apsolutnoj biološkoj raspoloživosti atenolola (Melander i sar, 1979). Korigovani input profil atenolola ukazuje na nešto bržu apsorpciju u odnosu na profile apsorpcije dobijene drugim metodama. Primenom Loo-Riegelman metode dobijen je input profil identičan profilu apsorpcije dobijenom numeričkom dekonvolucijom korišćenjem intravenskog profila kao referentnog. Iako su ove dve metode zasnovane na različitim pristupima, dobijeni rezultati su veoma slični i ukazuju na stepen apsorpcije od 38% nakon 4 h odnosno 42% nakon 24 h.

Profil brzine rastvaranja atenolola *in vivo* izračunat numeričkom dekonvolucijom ukazuje na potpuno rastvaranje atenolola nakon 1,5 h i u saglasnosti je sa visokom rastvorljivošću atenolola u fiziološkom opsegu pH vrednosti.

#### 4.9.4 *In vitro* ispitivanja

##### Raspadljivost tableta

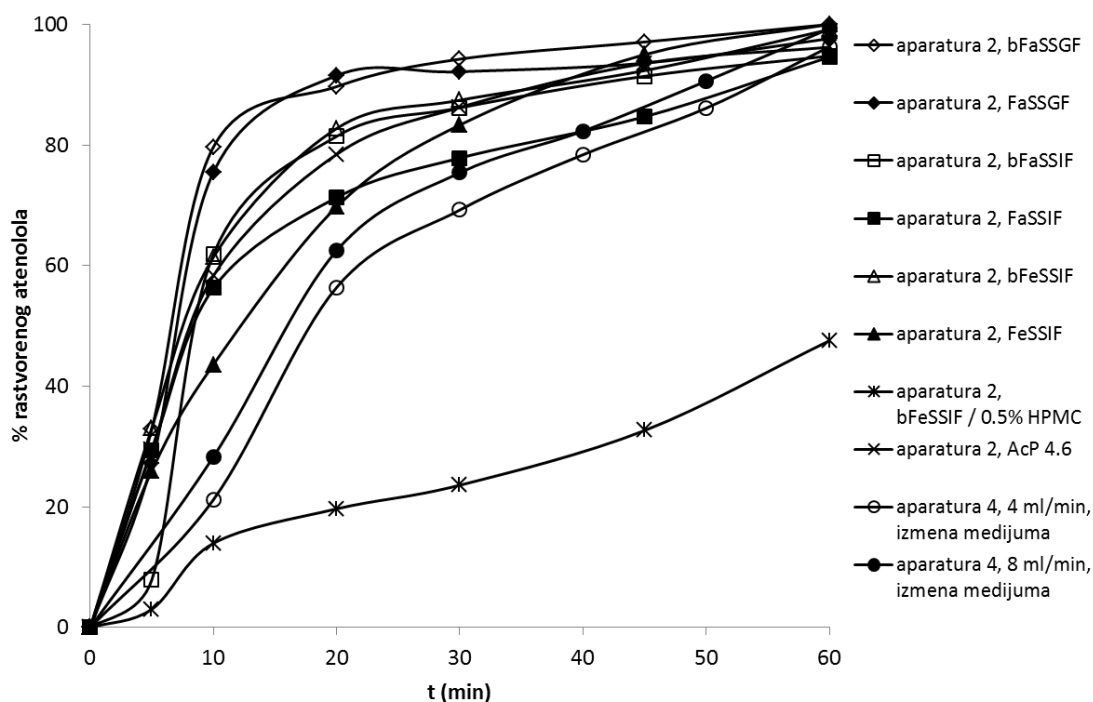
Raspadljivost tableta atenolola prikazana je na slici 106. Može se uočiti da se tablete veoma brzo raspadaju (nakon 1 min) u neviskoznim medijumima, kao i da sastav medijuma nema značajnog uticaja na raspadljivost tableta atenolola. Međutim, dodatak HPMC-a u medijum značajno odlaže raspadanje tableta atenolola (vreme raspadanja je 23 min) što bi se moglo objasniti smanjenim kvašenjem kao i usporenom penetracijom tečnosti u tabletu kada se koristi viskozni medijum.



Slika 106. Raspodljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem atenolola u različitim medijumima

### Brzina rastvaranja atenolola iz tableta

Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja atenolola iz tableta u aparaturi sa lopaticom uz primenu različitih medijuma i aparaturi sa protočnom ćelijom uz korišćenje izmene medijuma (15 min bFaSSGF / 45 min bFaSSIF) prikazani su na slici 107.



Slika 107. Profili brzine rastvaranja atenolola iz tableta pod različitim uslovima ispitivanja

Prikazani rezultati ukazuju da je u aparaturi sa lopaticom rastvaranje atenolola potpuno nakon 1 h, osim u slučaju ispitivanja u viskoznom medijumu. Profili dobijeni u aparaturi sa lopaticom bFaSSGF, FaSSGF, bFaSSIF, FaSSIF i AcP pH 4,6 odgovaraju brzom rastvaranju

odnosno više od 85% lekovite supstance rastvoreno je nakon 30 min ispitivanja. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa činjenicom da se radi o lako rastvorljivoj lekovitoj supstanci koja u fiziološkom opsegu pH vrednosti pokazuje pH-nezavisnu rastvorljivost, kao i da prisustvo fizioloških surfaktanata nema značajnog uticaja na rastvorljivost (Moneghini i sar, 1998; Cvijić i sar, 2014; Heikkilä i sar, 2011). U medijumu sa dodatkom HPMC-a uočeno je značajno sporije i nepotpuno rastvaranje atenolola (50% nakon 1 h), što bi se moglo objasniti sporijom dezintegracijom tableta u ovom medijumu i sporijom difuzijom lekovite supstance. Dobijeni rezultati mogli bi objasniti nižu biološku raspoloživost atenolola koja se uočava u *in vivo* studijama kada se atenolol uzima sa hranom (Melander i sar, 1979). U aparaturi sa protočnom ćelijom takođe je uočeno potpuno rastvaranje atenolola nakon 1 h, s tim što je brzina rastvaranja nešto sporija u poređenju sa aparaturom sa lopaticom. Ovakvi rezultati reflektuju blagu hidrodinamiku aparature sa protočnom ćelijom pri upotrebljenim brzinama protoka medijuma.

#### 4.9.5 *In silico* ispitivanja

U okviru ovog poglavlja biće opisana GI simulacija apsorpcije atenolola iz tableta korišćenjem programskih paketa Simcyp® i GastroPlus™ u cilju mehanističke interpretacije apsorpcije atenolola, identifikacije bioprediktivne metode za ispitivanje brzine rastvaranja i postavljanja klinički relevantnih specifikacija.

##### 4.9.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa

###### Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije atenolola iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa *Simcyp® Population - Based Simulator* (verzija 13.2, Certara™, SAD). Simulacija apsorpcije sprovedena je korišćenjem fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 82, čije su vrednosti preuzete iz literature ili su *in silico* predviđene. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja atenolola iz tableta korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. Validacija modela sprovedena je na osnovu srednjeg profila koncentracije atenolola u plazmi iz studije Melander i sar. (1979).

Apsorpcija atenolola iz GI trakta simulirana je korišćenjem ADAM modela. U simulacijama su korišćeni podaci o regionalnoj efektivnoj permeabilnosti atenolola (u jejunumu  $0,4 \cdot 10^{-4}$  cm/s; u ileumu  $0,25 \cdot 10^{-4}$  cm/s) iz studije Lennernäs (2014), dok je vrednost efektivne permeabilnosti u kolonu optimizovana korišćenjem *Simcyp® Parameter Estimation* opcije tako da se postigne što manje odstupanje simuliranog u odnosu na *in vivo* uočeni profil apsorpcije preuzet iz studije Melander i sar. (1979). Podatak o rastvorljivosti na pH 6,8 preuzet je iz ispitivanja Cvijić i sar. (2014). Volumen distribucije predviđen je u Simcyp®-u na osnovu potpunog PBPK modela distribucije i metode Poulin i Theil (metoda 1) i iznosi 0,5317 L/kg, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Kirch i Gorg, 1982). Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi preuzet je iz studije Taylor i Turner (1981), a vrednost slobodne frakcije leka u plazmi iz studije Vogelpoel i sar. (2004). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

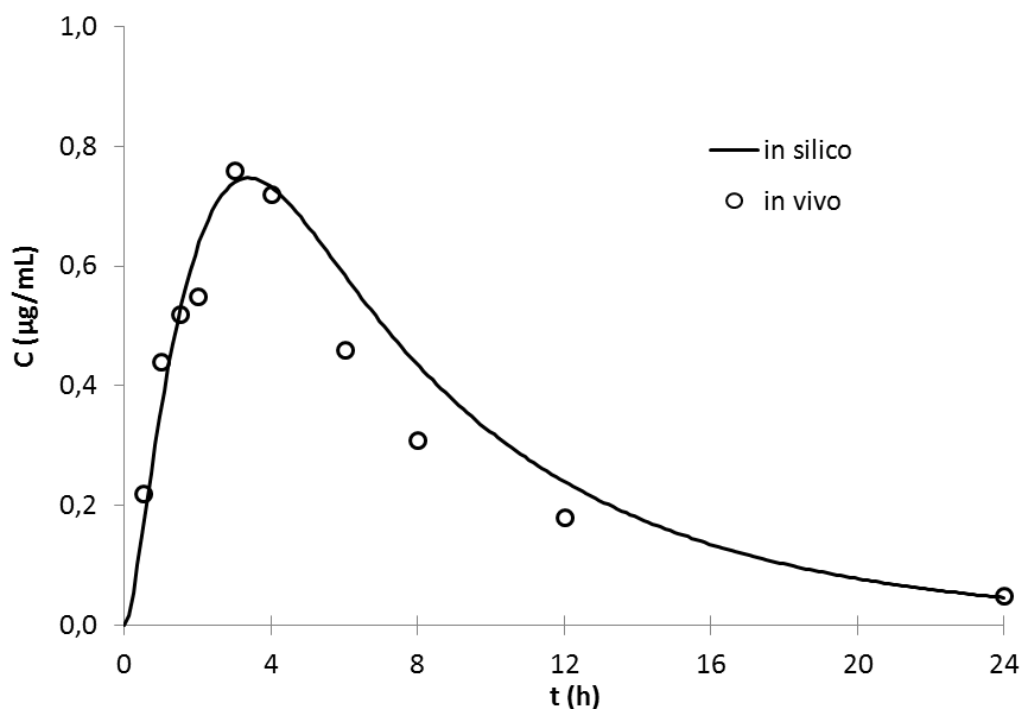
Simulirani profil koncentracije atenolola u plazmi na osnovu ulaznih parametara prikazanih u tabeli 82 u saglasnosti je sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Melander i sar, 1979) što je prikazano na slici 108.



Tabela 82. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije atenolola

Parametar (jedinica mere)	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	266,34
$\log P_{o:w}$	-0,11 <sup>a</sup>
Jednokisela baza	
pKa	9,6 <sup>b</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>c</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, $f_u$	0,94 <sup>b</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, $P_{eff}$ (cm/s)	$0,4 \cdot 10^{-4}$ <sup>d</sup>
Rastvorljivost (mg/ml)	29,64 na pH 6,8 <sup>e</sup>
Konstanta precipitacije ( $h^{-1}$ )	4 <sup>f</sup>
Radius čestica lekovite supstance ( $\mu m$ )	10 <sup>f</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>f</sup>
Distribucija	
Potpuni PBPK model, metoda 1	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, $V_{ss}$ (L/kg)	0,5317 <sup>g</sup>
Eliminacija	
$CL_{po}$ (L/h)	10,2 <sup>h</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	100
Vreme simulacije (h)	24
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250

<sup>a</sup> Podatak iz literature (Kasim i sar, 2004); <sup>b</sup> Podatak iz literature (Vogelpoel i sar, 2004); <sup>c</sup> Podatak iz literature (Taylor i Turner, 1981); <sup>d</sup> Objašnjeno u tekstu; <sup>e</sup> Podatak iz literature (Cvijić i sar, 2014); <sup>f</sup> Simcyp® osnovna vrednost; <sup>g</sup> Vrednost izračunata u Simcyp®-u korišćenjem potpunog PBPK modela distribucije; <sup>h</sup> Podatak iz literature (Borchard, 1998)



Slika 108. Simulirani profil koncentracije atenolola u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem i profil uočen *in vivo*

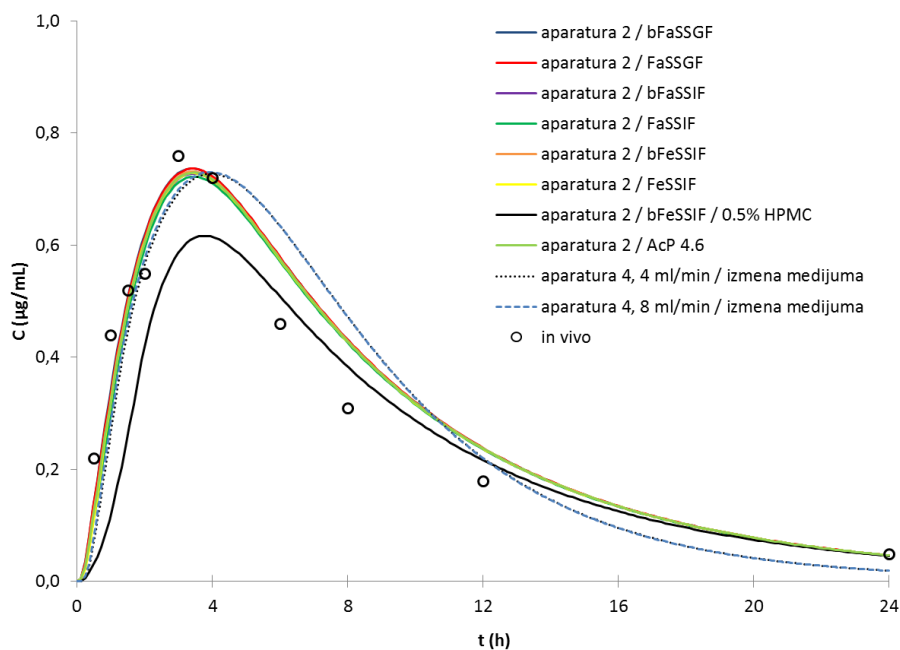
Tačnost predviđanja procenjena je izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), prikazanih u tabeli 83 i, s obzirom da njihove vrednosti ne prelaze 10%, model se smatra validiranim i kao takav korišćen je za dalja ispitivanja.

Tabela 83. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih greški predviđanja za tablete sa trenutnim oslobađanjem atenolola

Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{max}$ (µg/ml)	0,76	0,74	2,63
$t_{max}$ (h)	3,10	3,36	8,38
$PIK_{0-t}$ (µgh/ml)	6,89	7,16	3,91

### Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Da bi se ispitao uticaj brzine rastvaranja na profil koncentracije atenolola u plazmi, eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja atenolola korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije. Simulirani profili prikazani na slici 109 ukazuju da *in vitro* profil brzine rastvaranja atenolola nema značajnog uticaja na rezultate GI simulacije ukoliko je rastvaranje atenolola potpuno nakon 60 min. Nepotpuno oslobađanje atenolola zabeleženo u viskoznom medijumu uslovalo je simulaciju apsorpcije u manjem obimu u odnosu na farmakokinetički profil uočen *in vivo* (Melander i sar, 1979).



Slika 109. Simulirani profili koncentracije atenolola u plazmi na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja iz tableta sa trenutnim oslobađanjem zajedno sa *in vivo* uočenim profilom

Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), dobijenih na osnovu brzine rastvaranja atenolola iz tableta, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 84. Prikazani rezultati ukazuju da se u slučaju korišćenja eksperimentalno određenih profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom u svim medijumima izuzev viskoznog, dobija odlično slaganje simuliranog i stvarnog profila koncentracije atenolola u plazmi. Odlična predviđanja obima apsorpcije dobijena su i korišćenjem profila brzine rastvaranja u aparaturi sa

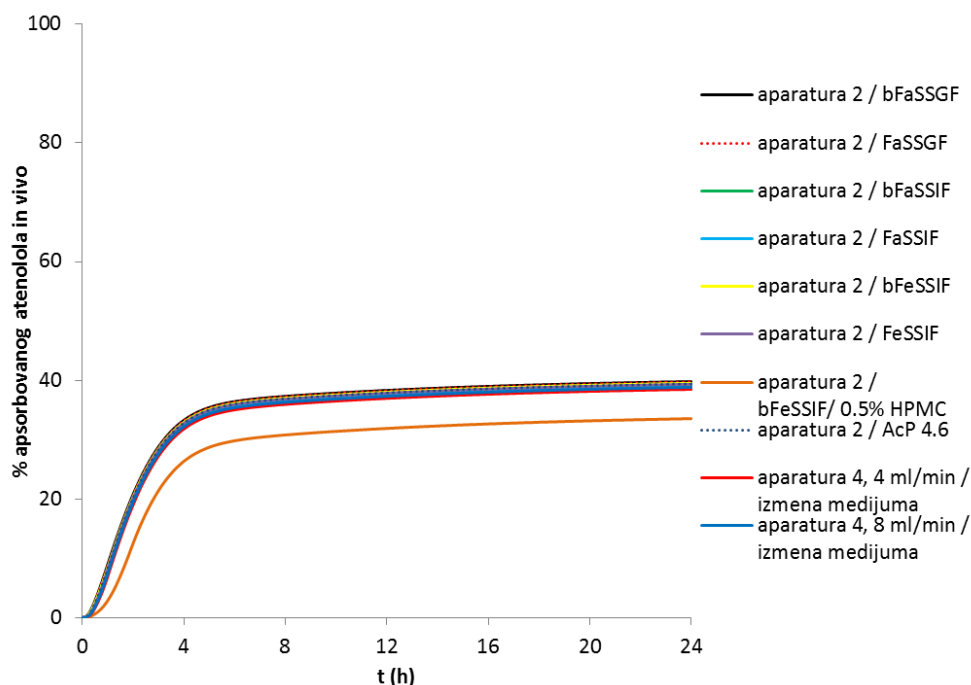
protočnom ćelijom s tim što je postizanje maksimuma koncentracije atenolola u plazmi neznatno odloženo u odnosu na *in vivo* situaciju (Melander i sar, 1979). U slučaju *in vitro* profila dobijenog u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje viskoznog medijuma zabeleženo je smanjenje PIK za oko 20% što odgovara literaturnim podacima o *in vivo* uticaju hrane na farmakokinetiku atenolola iz preparata sa trenutnim oslobađanjem.

Tabela 84. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja atenolola iz tableta, kao i odgovarajuće greške predviđanja

<i>In vitro</i> profil		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	PIK <sub>0-t</sub>	%PE
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
Aparatura 2	bFaSSGF	0,73	3,94	3,36	8,38	7,06	2,46
	FaSSGF	0,73	3,94	3,48	12,25	7,05	2,32
	bFaSSIF	0,72	5,26	3,48	12,25	6,97	1,16
	FaSSIF	0,72	5,26	3,48	12,25	6,91	0,29
	bFeSSIF	0,73	3,94	3,48	12,25	7,00	1,59
	FeSSIF	0,72	5,26	3,48	12,25	6,97	1,16
	bFeSSIF/0,5% HPMC	0,61	19,73	3,72	20,00	5,91	14,22
Aparatura 4	AcP pH 4,6	0,72	5,26	3,48	12,25	6,99	1,45
	4 ml/min	0,72	5,26	3,66	18,06	6,95	0,87
	8 ml/min	0,73	3,94	3,56	14,83	7,02	1,88
<i>In vivo</i> profil		<b>0,76</b>	/	<b>3,10</b>	/	<b>6,89</b>	/

### Identifikacija profila apsorpcije atenolola primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija procesa apsorpcije atenolola iz tableta sprovedena je korišćenjem validiranog modela GI simulacije. Cilj ovih ispitivanja bio je da se proceni mogućnost primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila kao i za kasniju uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i GI simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa.



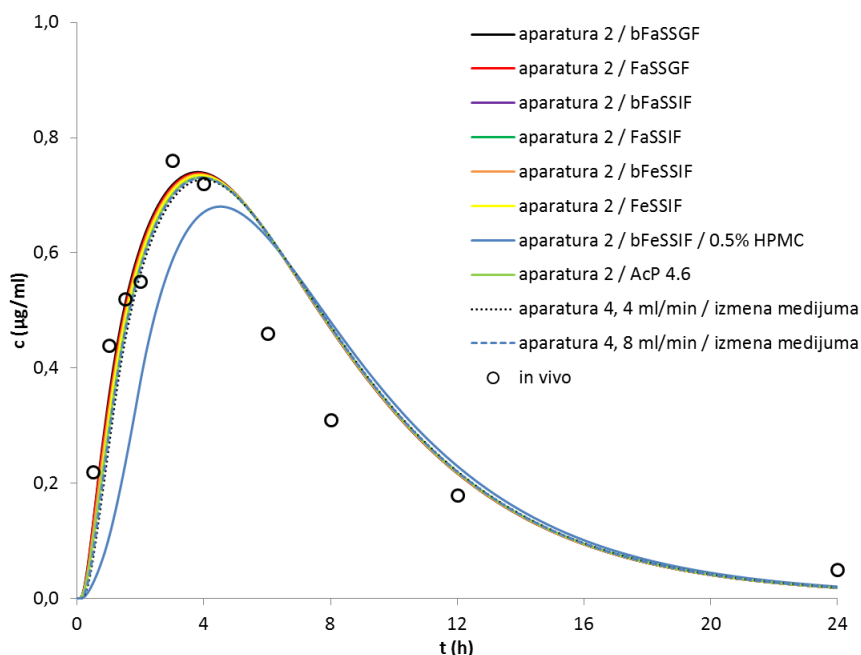
Slika 110. Hipotetički *in vivo* profili apsorpcije atenolola na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja atenolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem

*In silico* profili apsorpcije atenolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 110. Može se uočiti da u slučajevima kada brzina rastvaranja nije ograničavajući faktor (potpuno rastvaranje atenolola nakon 1 h), apsorpcija atenolola se odvija relativno brzo i iznosi oko 40 % nakon 4 h. Ovakvi rezultati u saglasnosti su literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti atenolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem (Fitzgerald, 1979; 1980; Heel i sar, 1979; Kirch i Gorg, 1982).

#### 4.9.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja vrednosti ulaznih parametara prikazane u tabeli 82 korišćene su s ciljem GI simulacije u okviru GastroPlus™ programskog paketa (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD). Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus-a™ nisu menjana prilikom izvođenja simulacija, izuzev ASF vrednosti koja je optimizovana i iznosi 2,3 u svim segmentima GI trakta. Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode Poulin i Theil kao i u slučaju Simcyp®-a, i dobijena je vrednost od 0,5496 L/kg što odgovara vrednosti predviđenoj u Simcyp®-u gde je predviđen volumen distribucije od 0,5317 L/kg.

Simulirani profili koncentracije atenolola u plazmi dobijeni u GastroPlus™-u na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja atenolola iz tableta prikazani su na slici 111. Može se uočiti da dobijeni profili odgovaraju profilima dobijenim u Simcyp®-u. I u ovom slučaju potvrđen je neznatan uticaj *in vitro* profila brzine rastvaranja na simulirani profil koncentracije atenolola u plazmi ukoliko je rastvaranje atenolola potpuno u toku 1 h.



Slika 111. Profili koncentracije atenolola u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu profila brzine rastvaranja lekovite supstance iz i profil uočem *in vivo*

Simulirane vrednosti osnovnih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 85. Prikazani rezultati ukazuju da se za sve *in vitro* profile, izuzev profila brzine rastvaranja u viskoznom medijumu, dobija odlično slaganje simuliranog i stvarnog profila koncentracije atenolola u plazmi. Može se uočiti da predviđeni obim apsorpcije u GastroPlus™-u odgovara onom u Simcyp®-u s obzirom da su dobijene identične vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ . Jedina razlika uočava se u vrednostima  $t_{max}$  koje ukazuju na nešto sporiju apsorpciju predviđenu GastroPlus™ programskim paketom, što se može

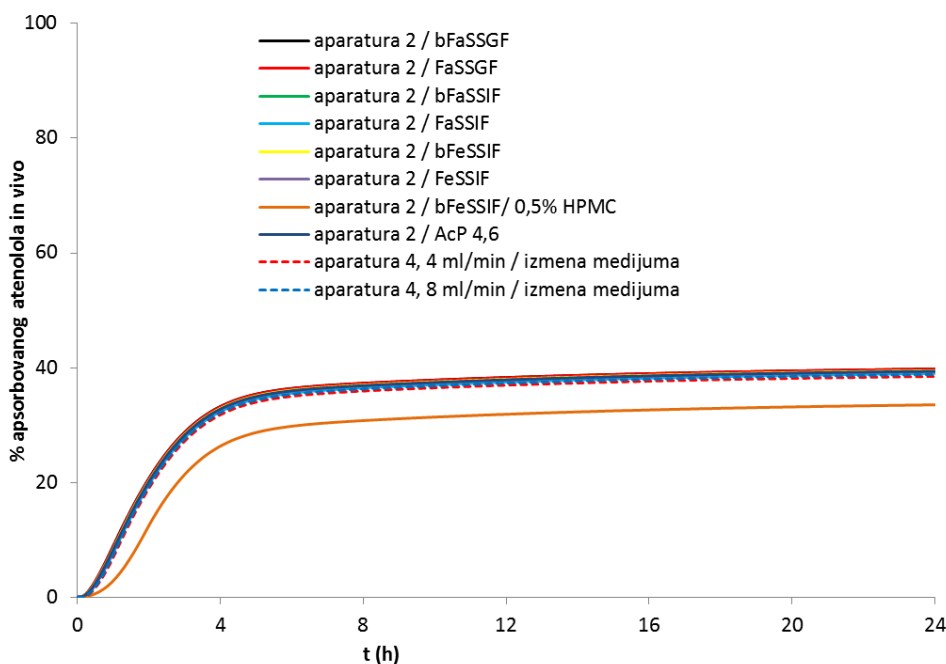
pripisati različitim vremenima zadržavanja u pojedinim delovima GI trakta u okviru ADAM odnosno ACAT modela (tabela 35).

Tabela 85. Farmakokinetički parametri predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu profila brzine rastvaranja atenolola iz tableta, kao i odgovarajuće greške predviđanja

<b><i>In vitro</i> profil</b>		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
Aparatura 2	bFaSSGF	0,74	2,63	3,84	23,87	6,92	0,43
	FaSSGF	0,73	3,94	3,84	23,87	6,91	0,29
	bFaSSIF	0,73	3,94	3,92	26,45	6,87	0,29
	FaSSIF	0,73	3,94	3,92	26,45	6,84	0,72
	bFeSSIF	0,73	3,94	3,84	23,87	6,89	0,00
	FeSSIF	0,73	3,94	3,92	26,45	6,87	0,29
	bFeSSIF/0,5% HPMC	0,68	10,52	4,56	47,09	6,36	7,69
	AcP 4,6	0,73	3,94	3,84	23,87	6,87	0,29
Aparatura 4	4 ml/min	0,72	5,26	4,00	29,03	6,79	1,45
	8 ml/min	0,73	3,94	3,92	26,45	6,82	1,01
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>0,76</b>	<b>/</b>	<b>3,10</b>	<b>/</b>	<b>6,89</b>	<b>/</b>

### Identifikacija profila apsorpcije atenolola primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

U ovoj fazi ispitana je mogućnost primene GI simulacije u GastroPlus™-u za identifikaciju *in vivo* inputa koji će se potom koristiti za uporednu analizu sa rezultatima dobijenim primenom drugih metoda dekonvolucije, kao i za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije. Hipotetički profili apsorpcije atenolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni u GastroPlus™-u prikazani su na slici 112.

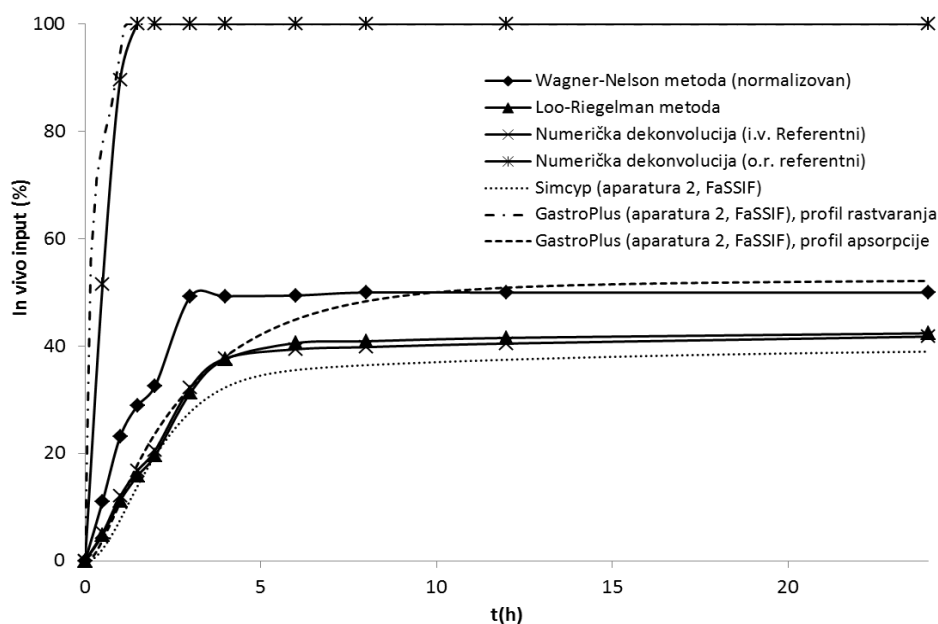


Slika 112. Hipotetički *in vivo* profili apsorpcije atenolola za tablete sa trenutnim oslobađanjem dobijeni GI simulacijom u GastroPlus®-u

Može se uočiti da je potpuno rastvaranje atenolola praćeno nepotpunom apsorpcijom što se može pripisati niskoj permeabilnosti atenolola (Vogelpoel i sar, 2004). Predviđeni obim apsorpcije atenolola od oko 50% u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti atenolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Kada se rezultati uporede sa

rezultatima dobijenim GI simulacijom u Simcyp<sup>®</sup>-u, može se uočiti da je u GastroPlus<sup>™</sup>-u predviđena nešto sporija apsorpcija atenolola ali je predviđeni obim apsorpcije nešto viši. Uočene razlike mogle bi se objasniti različitim vremenima zadržavanja u pojedinim segmentima GI trakta u okviru ADAM odnosno ACAT modela, kao i regionalnim razlikama u brzini apsorpcije usled primene apsorpcionog faktora proporcionalnosti u okviru ACAT modela (tabela 35).

Uporedni *in vivo* input profili dobijeni primenom različitih metoda dekonvolucije prikazani su na slici 113. Profili apsorpcije atenolola dobijeni GI simulacijom u Simcyp<sup>®</sup>-u na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila (izuzev profila dobijenog u viskoznom medijumu), pokazuju odlično slaganje sa profilima apsorpcije izračunatim Loo-Riegelman metodom i numeričkom dekonvolucijom u odnosu na i.v. profil kao referentni, dok je korišćenjem istih *in vitro* profila u GastroPlus<sup>™</sup>-u predviđena nešto brža apsorpcija, kao i viši % apsorbovanog leka. Profili rastvaranja predviđeni u GastroPlus<sup>™</sup>-u na osnovu istih *in vitro* profila brzine rastvaranja atenolola poklapaju se sa profilom rastvaranja dobijenim numeričkom dekonvolucijom u odnosu na oralni rastvor kao referentni profil. Na slici 123 su radi preglednosti prikazani samo profili dobijeni na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje FaSSIF-a.



Slika 113. Uporedni prikaz *in vivo* input profila atenolola dobijeni različitim metodama dekonvolucije

## 4.9.6 *In vitro-in vivo* korelacija

### Dekonvolucionni pristup

U cilju uspostavljanja korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, input profili izračunati različitim metodama analizirani su u odnosu na *in vitro* rezultate dobijene ispitivanjem brzine rastvaranja atenolola iz tableta pod različitim eksperimentalnim uslovima. S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, *in vitro* vremenska skala korigovana je faktorom korekcije TS. Input profili dobijeni korišćenjem različitih dekonvolucionih metoda, kao i eksperimentalni profili brzine rastvaranja analizirani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Vrednosti TS faktora izračunate su kao odnos  $\tau_{divivo}$  i  $\tau_{divitro}$  (tabela 86). Može se uočiti da se vrednosti faktora TS značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene metode, kao i *in vitro* profila i kreću se u opsegu od 0,45 do 462,72.

Tabela 86. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem atenolola kao i odgovarajući faktori skaliranja vremenske ose

<i>In vitro</i> profil				TS						
Uređaj	Medijum/ protok	$\tau_a$ (h)	$\beta$	Wagner- Nelson metoda	Wagner- Nelson metoda (normalizovan)	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Numerička dekonvolucija (o.r.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Aparatura 2	bFaSSGF	0,13	1,88	11,92	250,30	375,51	441,76	4,57	682,72	203,52
	FaSSGF	0,14	2,04	11,07	232,60	349,00	410,58	4,25	634,54	190,19
	bFaSSIF	0,22	1,38	7,06	148,31	222,57	261,76	2,71	404,54	123,61
	FaSSIF	0,26	0,73	5,95	125,00	187,56	220,58	2,28	340,90	104,16
	bFeSSIF	0,19	0,90	8,08	169,64	254,52	299,41	3,10	462,72	141,38
	FeSSIF	0,27	1,04	5,69	119,63	179,54	211,17	0,45	326,36	99,72
	bFeSSIF/0,5 % HPMC	1,75	0,96	0,90	19,01	28,54	33,52	0,34	71,25	19,00
	AcP 4,6	0,21	0,91	3,58	75,36	113,00	132,90	1,37	226,00	62,77
Aparatura 4	4 ml/min	0,44	1,24	7,23	152,00	228,00	268,23	2,78	414,54	130,28
	8 ml/min	0,37	1,19	4,19	88,00	132,00	155,29	1,60	240,00	73,53

Tabela 87. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem atenolola (dekonvolucioni pristup)

<i>In vitro input/ in vivo input</i>		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Wagner- Nelson metoda	Wagner- Nelson metoda (normalizovan)	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija (i.v.)	Numerička dekonvolucija (o.r.)	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uređaj	Medijum/ protok								
Aparatura 2	bFaSSGF	a	0,9790	0,8878	1,4964	1,6786	1,0095	2,5833	1,1947
		r	0,9773	0,5792	0,6970	0,6873	0,9930	0,7044	0,7208
	FaSSGF	a	0,9792	0,8910	1,6835	1,8885	1,0132	2,9065	1,1616
		r	0,9798	0,5582	0,6970	0,6873	0,9935	0,7047	0,6907
	bFaSSIF	a	0,9727	0,3772	1,1882	2,3263	1,0441	6,3594	0,7202
		r	0,9723	0,3567	0,5088	0,5812	0,9798	0,7047	0,5430
	FaSSIF	a	1,0896	0,6441	0,8750	0,9684	1,0184	1,4503	1,0842
		r	0,9675	0,6292	0,7057	0,6931	0,9693	0,7047	0,8185
	bFeSSIF	a	1,0656	0,6987	1,0336	1,1325	1,0343	1,7429	1,0620
		r	0,9847	0,6092	0,7020	0,6876	0,9835	0,7047	0,7740
	FeSSIF	a	1,0398	0,7934	1,0681	1,1414	0,9412	1,5666	1,2399
		r	0,9897	0,6548	0,7325	0,7116	0,8903	0,7047	0,8253
	bFeSSIF/0,5 % HPMC	a	0,9463	0,6384	1,0851	1,2000	1,0215	1,5530	1,0812
		r	0,9393	0,6505	0,8031	0,7929	0,9313	0,6702	0,7849
AcP 4,6	a	1,0917	0,5069	1,0235	1,1403	1,0326	1,7488	1,0841	
	r	0,9568	0,6881	0,6992	0,6881	0,9836	0,7047	0,7716	
Aparatura 4	4 ml/min	a	0,8811	1,8067	1,1853	1,4841	1,0165	2,6748	0,8805
		r	0,9542	0,5924	0,6617	0,6746	0,9940	0,7047	0,8452
	8 ml/min	a	1,0023	0,7046	1,2057	1,3826	1,0190	2,1278	0,8601
		r	0,9877	0,5722	0,6924	0,6873	0,9932	0,7047	0,8477

a – nagib regresione prave r – koeficijent korelacije



Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom *in vitro* i *in vivo* podataka prikazani su u tabeli 87. Visok nivo korelacije, opisan vrednostima *r* većim od 0,95, dobijen je u svim ispitivanim slučajevima izuzev kada je *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja rađeno korišćenjem viskoznog medijuma, u poređenju sa *in vivo* profilima, dobijenim Wagner-Nelson metodom i numeričkom dekonvolucijom u odnosu na oralni rastvor.

### Konvolucionni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju IVIVK, profili koncentracije atenolola u plazmi predviđeni primenom GI simulacije u Simcyp® i GastroPlus™ programskim paketima na osnovu različitih *in vitro* profila brzine rastvaranja, analizirani su u odnosu na srednje farmakokinetičke profile uočene u *in vivo* studiji Melander i sar. (1979). Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 88 ukazuju na visok nivo IVIVK analiziranih setova podataka. Visok nivo korelacije, opisan vrednošću koeficijenta korelacije većim od 0,95 i nagibom regresione prave blizu jedinice, dobijen je za sve *in vitro* eksperimentalne uslove izuzev u slučaju ispitivanja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje viskoznog medijuma.

Tabela 88. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparat sa trenutnim oslobađanjem atenolola primenom GI simulacije (konvolucionni pristup)

Uređaj	<i>In vitro</i> profil	Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
	Medijum/protok	a	r	a	r
Aparatura 2	bFaSSGF	0,9097	0,9651	0,8269	0,9515
	FaSSGF	0,9115	0,9636	0,8315	0,9518
	bFaSSIF	0,9166	0,9597	0,8238	0,9523
	FaSSIF	0,9161	0,9537	0,8189	0,9476
	bFeSSIF	0,9124	0,9607	0,8275	0,9579
	FeSSIF	0,9103	0,9578	0,8193	0,9315
	bFeSSIF/0,5%HPMC	0,9596	0,8696	0,7581	0,8171
	AcP 4,6	0,9107	0,9582	0,8205	0,9314
Aparatura 4	4 ml/min	0,9183	0,9564	0,8049	0,9143
	8 ml/min	0,9161	0,9522	0,8093	0,9504

Ispitivanje brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom ukazuje da je rastvaranje atenolola relativno brzo i potpuno nakon 1 h ispitivanja, izuzev u viskoznom medijumu, kao i da sastav i pH vrednost medijuma nemaju značajnog uticaja na brzinu rastvaranja atenolola. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa visokom i pH nezavisnom rastvorljivošću atenolola u fiziološkom opsegu pH vrednosti. Povećanjem viskoziteta medijuma uočeno je značajno sporije i nepotpuno rastvaranje (50% nakon 1 h) što bi se moglo objasniti sporijim raspadanjem tableta u viskoznom medijumu, kao i sporijom difuzijom lekovite supstance u medijum. U aparaturi sa protočnom ćelijom zabeleženo je nešto sporije rastvaranje, ali je nakon 1h ispitivanja rastvoreno 100% atenolola.

Na osnovu odabranog seta ulaznih podataka, primenom oba programska paketa uspešno je simuliran profil koncentracije atenolola u plazmi koji prati oralnu primenu tableta sa trenutnim oslobađanjem, što potvrđuju i greške predviđanja relevantnih farmakokinetičkih parametara koje su niže od 10%. Predviđeni obim apsorpcije leka u skladu je sa literaturnim podacima. Simulacijama je pokazano da *in vitro* profil brzine rastvaranja atenolola iz tableta sa trenutnim oslobađanjem nema značajnog uticaja na profil koncentracije leka u plazmi ukoliko je *in vitro* zabeleženo potpuno rastvaranje atenolola nakon 60 min, pa čak i u slučaju nešto sporijeg rastvaranja koje je zabeleženo u aparaturi sa protočnom ćelijom.

U postupku uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije primenom dekonvolucionog pristupa analizi podataka, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je odgovarajućim faktorom skaliranja kako bi se dobili profili koji se najbolje slažu sa *in vivo* profilima. Oba

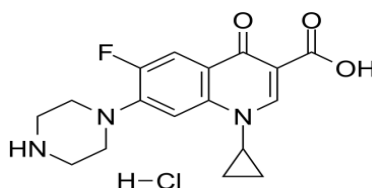
pristupa su pokazala da je nivo A korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka postignut kada je zabeleženo potpuno rastvaranje atenolola nakon 1h, odnosno za *in vitro* profile dobijene pod svim ispitivanim eksperimentalnim uslovima izuzev ispitivanja u aparaturi sa lopaticom u viskoznom medijumu.

Dobijeni rezultati takođe govore u prilog ideji da brzina rastvaranja lekova koji pripadaju BCS klasi 3 ne mora nužno da bude u skladu sa „veoma brzim“ rastvaranjem (više od 85% rastvoreno u toku 15 minuta) kako bi se obezbedila potpuna apsorpcija, već je i na primeru atenolola pokazano da se može postaviti šira klinički relevantna specifikacija.

## 4.10 MODEL HIDROHLORID

## SUPSTANCA:

## CIPROFLOKSACIN-



1-ciklopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-okso-7-(piperazin-1-il)-hinolin-3-karbonska kiselina

Slika 114. Strukturna formula i hemijski naziv ciprofloksacin-hidrohlorida

Ciprofloksacin je antibiotik iz grupe fluorohinolona i pokazuje širok spektar delovanja. Doziranje zavisi od indikacije, težine i mesta infekcije, osetljivosti uzročnika na ciprofloksacin, renalne funkcije pacijenta, a kod dece i adolescenata i od telesne mase. Uobičajna doza za odrasle iznosi 500-750 mg, dva puta dnevno (Martindale, 2020). Detaljan pregled fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i biofarmaceutskih svojstava ciprofloksacina prikazan je u okviru odgovarajuće FIP Biowaiver monografije (Olivera i sar, 2011). U Republici Srbiji, ciprofloksacin je dostupan u obliku film tableta ciprofloksacin-hidrohlorida (250 i 500 mg) različitih proizvođača (ALIMS, 2022).

### 4.10.1 Biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva ciprofloksacina

Ciprofloksacin je cviter jon i poseduje dve pKa vrednosti, pKa<sub>1</sub> 6,16 i pKa<sub>2</sub> 8,62 (Kozjek i sar, 1996). Pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost u fiziološkom opsegu pH vrednosti (Kozjek i sar, 1996). Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida na pH 1,2 iznosi 12,68 mg/ml, na pH 4,04 je 42,00 mg/ml, dok na pH 6,8 iznosi 0,12 mg/ml, na temperaturi od 37°C (Stojković, 2014).

Ispitivanje permeabilnosti ciprofloksacina na Caco-2 kulturi ćelija, je pokazalo da ciprofloksacin pokazuje nisku permeabilnost kroz apikalnu i bazolateralnu membranu intestinuma. Vrednost za P<sub>app</sub>, kada je ciprofloksacin prisutan u koncentraciji od 3 mg/ml, iznosi 2,49 ± 0,43 · 10<sup>-6</sup> cm/s, a kada je prisutan u koncentraciji od 0,3 mg/ml iznosi 0,42 ± 0,06 · 10<sup>-6</sup> cm/s (Volpe, 2004). Ispitivanje permeabilnosti kroz izolovani jejunum pacova dalo je vrlo slične rezultate (Žakelj i sar, 2006). Rezultati ispitivanja permeabilnosti na PAMPA veštačkim membranama je pokazalo da je permeabilnost ciprofloksacina pH zavisna (Bermejo i sar, 2004). Ciprofloksacin podleže aktivnom transportu u GI traktu koji je odgovoran za varijabilnu farmakokinetiku ciprofloksacina (Žakelj i sar, 2006; Cavet i sar, 1997).

Nakon oralne primene, ciprofloksacin se apsorbuje relativno brzo a biološka raspoloživost varira u opsegu od 52-90 % (Hoffken i sar, 1985; Bergan i sar, 1986; Drusano i sar, 1986; Plaisance i sar, 1987; Lettieri i sar, 1992). Ciprofloksacin pokazuje dozno-zavisnu farmakokinetiku. Maksimum koncentracije lekovite supstance u plazmi postiže se 0,58 – 1,75 h nakon primene leka. Harder i sar (1990) su u ispitivanju sa hf-kapsulom, čiji dizajn omogućava ciljano oslobađanje u određenom segmentu GI trakta pokazali da se ciprofloksacin primarno apsorbuje u tankom crevu, pri čemu je više od 78 % doze apsorbovano u duodenumu i jejunumu (Harder i sar, 1990). Uzimanje hrane produžava vreme postizanja maksimalne koncentracije

lekovite supstance u plazmi bez uticaja na ostale farmakokinetičke parametre (Shah i sar, 1999; Ledergerber i sar, 1985; Neuhofel i sar, 2002).

Vezivanje za proteine plazme iznosi oko 30% (Bergan, 1990). Ciprofloksacin pokazuje veliki volumen distribucije i iznosi oko 2,27 l/kg kada se primeni doza od 100 mg i 2,44 l/kg nakon primene doze od 200 mg (Drusano i sar, 1986), što ukazuje da lek prelazi u preriferne tkiva.

Poluvreme eliminacije kreće se u opsegu 3,5 – 4,5 h, i može biti produženo kod pacijenata sa renalnom insuficijencijom (Shah i sar, 1996). Oko 10-20% lekovite supstance podleže metabolizmu u jetri putem CYP 450 izoenzima.

S obzirom na pH-zavisnu rastvorljivost, s ciljem njegove BCS klasifikacije, potrebno je razmotriti najmanju rastvorljivost u okviru fiziološkog raspona pH vrednosti, te se u skladu sa navedenim, ciprofloksacin opisuje kao nisko rastvorljiva supstanca. S obzirom na varijabilnu permeabilnost i “prozor za apsorpciju“ u gornjim delovima intestinuma, kao i rezultate ispitivanja permeabilnosti na Caco-2 ćelijama i izolovanom jejunumu pacova, ciprofloksacin se opisuje kao supstanca sa niskom permeabilnošću. U skladu sa navedenim, ciprofloksacin se uglavnom svrstava u klasu 4 Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (Breda i sar, 2009; Olivera i sar, 2011; Lindenberg i sar, 2004). Međutim, Hansmann i sar. (2018) su na osnovu rezultata PBPK analize ukazali da, iako se radi o supstanci koja pokazuje granične vrednosti rastvorljivosti i permeabilnosti, njeno ponašanje *in vivo* odgovara karakteristikama supstance BCS klase 1.

#### 4.10.2 *In vivo* podaci

Detaljnim pregledom *in vivo* studija dostupnih u literaturi za različite farmaceutske oblike ciprofloksacin-hidrohlorida, s ciljem njegove biofarmaceutske karakterizacije izabrani su profili koncentracija ciprofloksacina u plazmi dobijeni nakon intravenske primene i oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem u studiji Lettieri i sar. (1992).

Lettieri i sar. (1992) poredili su farmakokinetičke profile dobijene nakon i.v. (300 mg i 400 mg) i oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem (500 mg i 750 mg). Došli su do zaključka da su vrednosti farmakokinetičkih parametara dozno-zavisne, da apsolutna biološka raspoloživost iznosi 62-90%, i da renalni klirens predstavlja oko 60% ukupnog klirensa. Osnovni farmakokinetički parametri uočeni nakon primene izabranih farmaceutskih oblika ciprofloksacin-hidrohlorida prikazani su u tabeli 89.

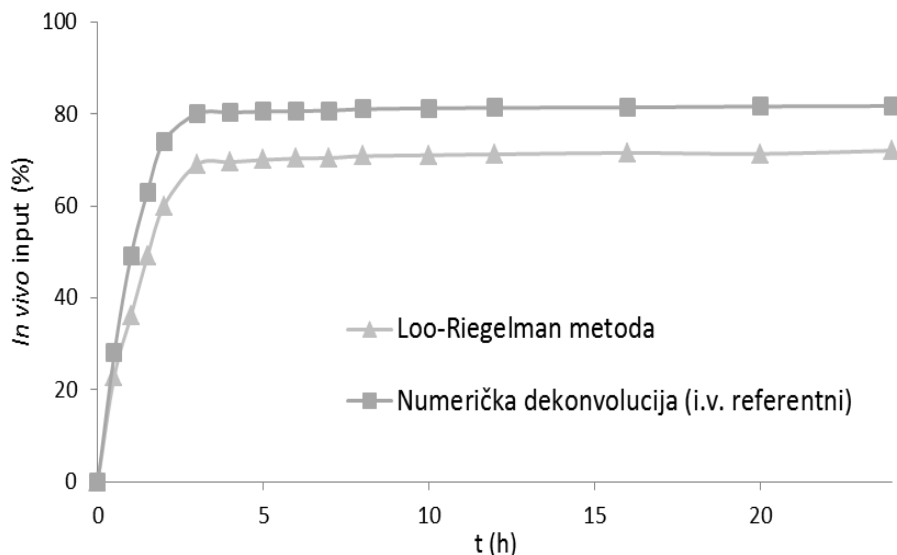
Tabela 89. Farmakokinetički parametri različitih farmaceutskih oblika ciprofloksacin-hidrohlorida

Farmaceutski oblik (Doza)	PIK <sub>0-t</sub> (mgh/L)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	Referenca
i.v. bolus injekcija (400 mg)	11,4±1,6	4,0±0,6	4,4±6,8	/	Lettieri i sar. (1992)
Tableta sa trenutnim oslobađanjem (500 mg)	10,7±2,6	2,7±0,8	5,7±1,2	1,3	Lettieri i sar. (1992)

#### 4.10.3 Identifikacija i uporedna analiza *in vivo* input profila ciprofloksacina dobijenih primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda

U cilju dobijanja profila brzine apsorpcije ciprofloksacina *in vivo* primenjene su Loo-Riegelman metoda i numerička dekonvolucija u odnosu na profil dobijen nakon intravenske primene upotrebom softverskog paketa Kinetica 5.0 i literaturnih profila koncentracija ciprofloksacina u plazmi nakon primene analiziranih preparata. *In vivo* input profili dobijeni

Loo-Riegelman metodom i numeričkom dekonvolucijom na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene kao težinske funkcije prikazani su na slici 115. Dobijeni rezultati pokazuju da je nešto brža apsorpcija i veći obim apsorpcije predviđen korišćenjem Loo-Riegelman metode (oko 81%) u poređenju sa numeričkom dekonvolucijom (oko 72%) iako su korišćeni isti ulazni podaci. Obe izračunate vrednosti biološke raspoloživosti odgovaraju rasponu uočenom *in vivo*.



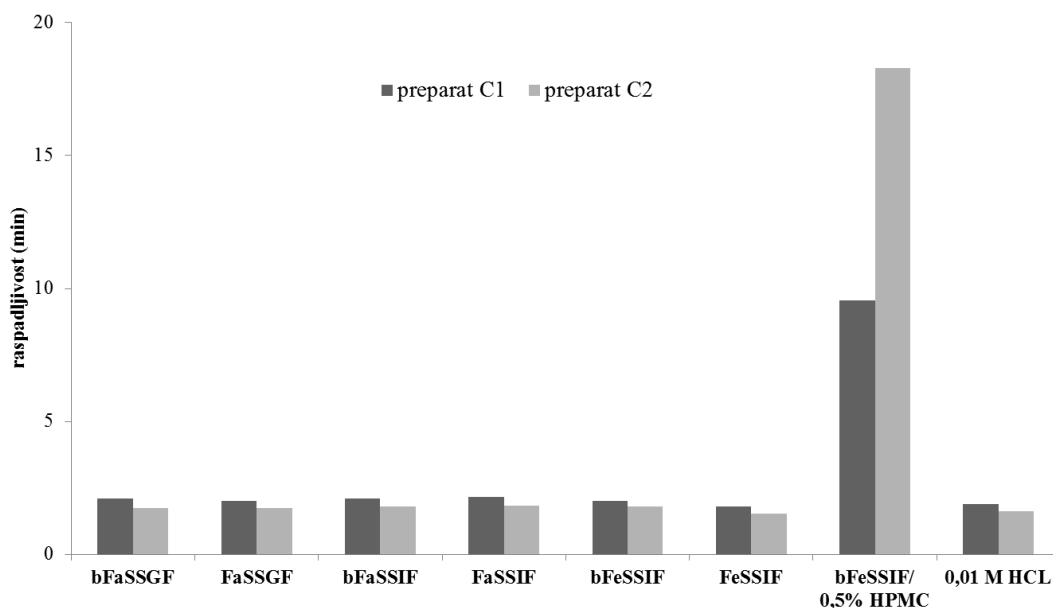
Slika 115. *In vivo* input profili ciprofloksacina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni primenom različitih farmakokinetičkih metoda

#### 4.10.4 *In vitro* ispitivanja

Ispitivanje raspadljivosti tableta sprovedeno je u cilju procene uticaja različitih medijuma na raspadljivost ispitivanih tableta i, posledično, njegovu brzinu rastvaranja. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta obuhvatilo je razmatranje uticaja različitih eksperimentalnih uslova: vrste i sastava medijuma, kao i tipa aparature na kinetiku rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida. Kao medijumi za ispitivanje korišćeni su: 0,01 M HCl, viskozni medijum (0,5% HPMC u bFeSSIF), kao i fiziološki zasnovani medijumi (sa i bez lecitina i tauroholata). Ispitivanje je sprovedeno u aparaturi sa lopaticom (aparatura 2), i aparaturi sa protočnom ćelijom (aparatura 4). U ispitivanju su korišćena dva komercijalno dostupna preparata tipa film tableta, C1 i C2 (kvalitativni sastav preparata naveden je u okviru Priloga 1).

#### Raspadljivost tableta

Rezultati ispitivanja raspadljivosti uzoraka tableta C1 i C2 u različitim medijumima prikazani su na slici 116. Može se uočiti da se, izuzev u viskoznom medijumu, oba preparata raspadaju za oko 2 min i da se među preparatima C1 i C2 ne uočavaju razlike u pogledu raspadljivosti. Duže vreme potrebno za raspadanje tableta zabeleženo je za oba preparata u viskoznom medijumu gde su uočene i značajne razlike između preparata (preparat C1 raspada se nakon 9,54 min, dok se preparat C2 raspada nakon 18,3 min).

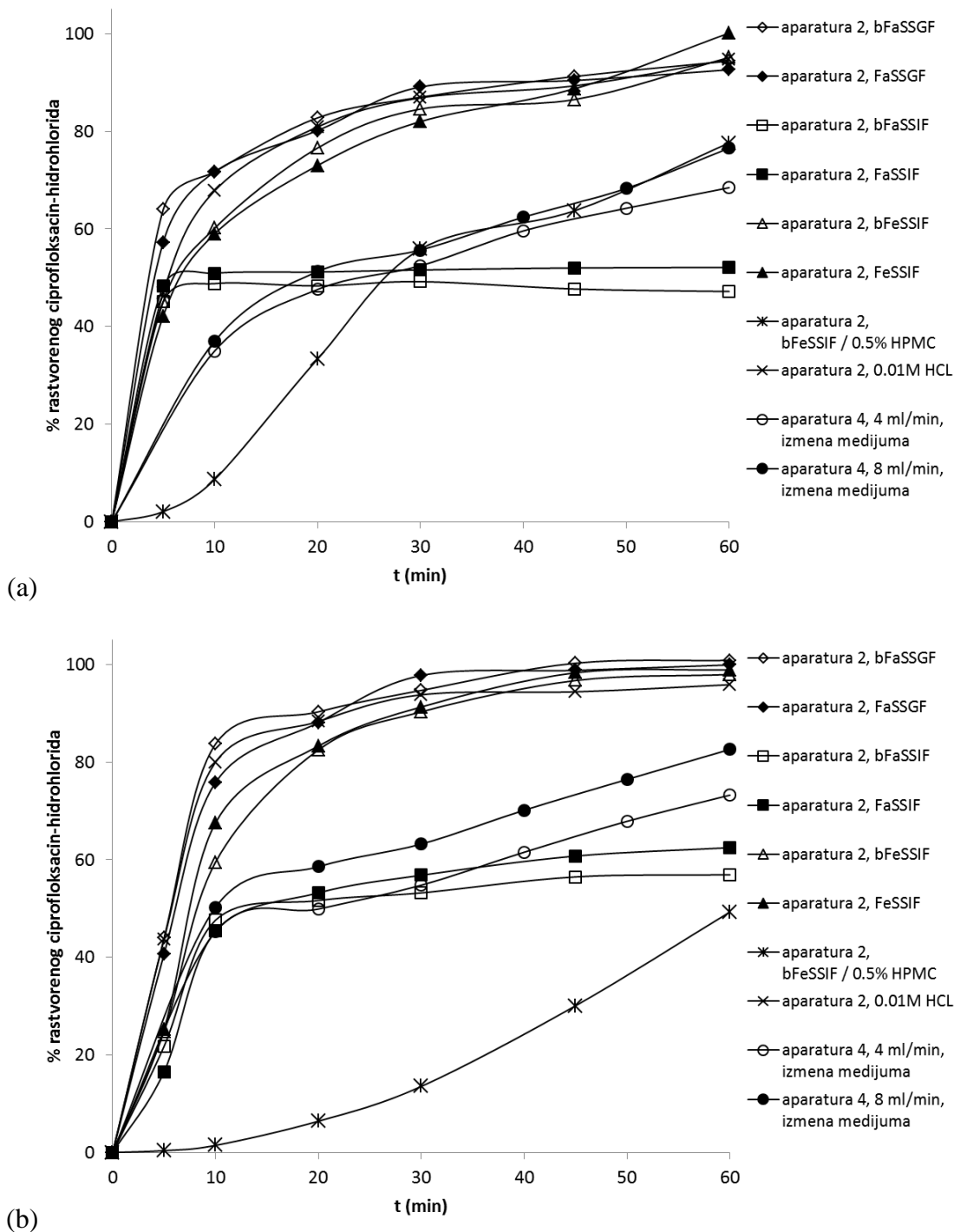


Slika 116. Raspadljivost film tableta ciprofloksacin-hidrohlorida (preparati C1 i C2) u različitim medijumima

### Brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta

Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz ispitivanih film tableta prikazani su na slici 117a za preparat C1, odnosno 117b za preparat C2.

Prikazani rezultati ukazuju da je, za oba ispitivana preparata, u aparaturi sa lopaticom kada su kao medijum korišćeni FaSSGF (pH 1,6), FeSSIF (pH 5,0) i odgovarajući puferi bez lecitina i tauroholata, kao i 0,01M HCl nakon 30 min rastvoreno više od 85% lekovite supstance. Nije zabeležen uticaj prisustva fizioloških surfaktanata u FaSSGF i FeSSIF. U medijumima pH vrednosti 6,5 (bFaSSIF i FaSSIF) je, za oba ispitivana preparata, nakon 10 min ispitivanja rastvoreno oko 50% lekovite supstance nakon čega se uočava plato. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa pH-zavisnom rastvorljivošću ciprofloksacin-hidrohlorida gde sa porastom pH vrednosti medijuma opada njegova rastvorljivost. U slučaju kada je za ispitivanje korišćen medijum sa dodatkom HPMC-a uočeno je značajno sporije i nepotpuno rastvaranje lekovite supstance. U slučaju preparata C1 nakon 60 min ispitivanja rastvoreno je oko 75%, dok je iz preparata C2 rastvoreno oko 45% lekovite supstance. Ovakvi rezultati u skladu su sa razlikama uočenim ispitivanjem raspadljivosti tableta u viskoznom medijumu (slika 116). U aparaturi sa protočnom ćelijom uočeno je značajno sporije rastvaranje ciprofloksacin-hidrohlorida za oba ispitivana preparata (oko 70% nakon 60 min ispitivanja). Početno, relativno brzo rastvaranje praćeno je sporijim rastvaranja u periodu nakon promene medijuma što se može pripisati porastu pH vrednosti medijuma (sa pH 1,6 na pH 6,5). Preparati C1 i C2 se pri navedenim eksperimentalnim uslovima ponašaju slično. Ovakvi rezultati reflektuju blagu hidrodinamiku aparature sa protočnom ćelijom pri upotrebljenim brzinama protoka medijuma, kao i pH-zavisnu rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida.



Slika 117. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz film tableta: preparat C1 (a) i preparat C2 (b)

#### 4.10.5 *In silico* ispitivanja

U okviru ovog poglavlja opisani su rezultati GI simulacije apsorpcije ciprofloksacina iz film tableta korišćenjem programskih paketa Simcyp<sup>®</sup> i GastroPlus<sup>™</sup> u cilju mehanističke interpretacije apsorpcije, identifikacije biorelevantne metode za ispitivanje brzine rastvaranja i postavljanja klinički relevantnih specifikacija za tablete ciprofloksacin-hidrohlorida.

#### 4.10.5.1 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem Simcyp® programskog paketa

##### Razvoj i validacija modela

Simulacija apsorpcije ciprofloksacina iz GI trakta sprovedena je upotrebom komercijalno dostupnog programa *Simcyp® Population - Based Simulator* (verzija 13.2, Certara™, SAD). Simulacija apsorpcije sprovedena je korišćenjem fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara prikazanih u tabeli 90, čije su vrednosti preuzete iz literature ili su *in silico* predviđene. Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz preparata C1 i C2 korišćeni su kao ulazni farmaceutsko-tehnološki parametri za simulaciju apsorpcije. Validacija modela sprovedena je na osnovu srednjeg profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi preuzetog iz studije Lettieri i sar. (1992).

Tabela 90. Prikaz ulaznih parametara korišćenih za razvoj modela GI simulacije ciprofloksacina

Parametar (jedinica mere)	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	385,8
$\log P_{o:w}$	1,32 <sup>a</sup>
Amfoterna supstanca	
$pK_{a1}^*$	6,2 <sup>b</sup>
$pK_{a2}^*$	8,59 <sup>b</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>c</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, $f_u$	0,7 <sup>d</sup>
Apsorpcija	
ADAM model	
Efektivna permeabilnost, $P_{eff}$ (cm/s)	$1,98 \cdot 10^{-4e}$
pH-zavisni profil rastvorljivosti (mg/ml)	12,68 na pH 1,2 <sup>f</sup> 42,00 na pH 4,04 <sup>f</sup> 0,12 na pH 6,8 <sup>f</sup>
Konstanta precipitacije ( $h^{-1}$ )	0,0001 <sup>g</sup>
Radius čestica lekovite supstance ( $\mu m$ )	10 <sup>c</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>c</sup>
Distribucija	
Potpuni PBPK model, metoda 2	
Volumen distribucije u stanju ravnoteže, $V_{ss}$ (L/kg)	1,4857 <sup>h</sup>
Eliminacija	
$CL_{iv}$ (L/h)	35,82 <sup>i</sup>
$CL_R$ (L/h)	21,48 <sup>i</sup>
Dizajn studije	
Reprezentativni pojedinac <i>Sim-Healthy Volunteers</i> populacije	
Doza (mg)	500
Vreme simulacije (h)	24
Zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250

\* $pK_{a1}$  tretirana je kao kiselina a  $pK_{a2}$  kao bazna

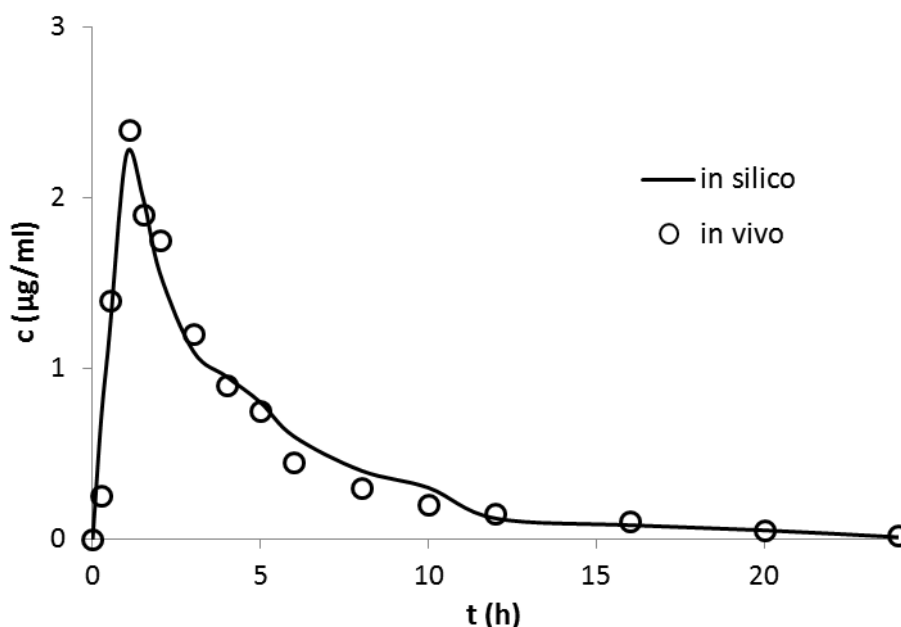
<sup>a</sup> Podatak iz literature (Kasim i sar, 2004); <sup>b</sup> Podatak iz literature (Escribano i sar, 1997); <sup>c</sup> Simcyp® vrednost; <sup>d</sup> Podatak iz literature (Bergan, 1990); <sup>e</sup> Objašnjeno u tekstu; <sup>f</sup> Podatak iz literature (Stojković, 2014); <sup>g</sup> Vrednost predviđena na osnovu Simcyp® Parameter Estimation opcije <sup>h</sup> Vrednost izračunata u Simcyp®-u korišćenjem potpunog PBPK modela distribucije; <sup>i</sup> Podatak iz literature (Lettieri i sar, 1992)

Kao apsorpcioni model u svim simulacijama korišćen je ADAM model. Ciprofloksacin-hidrohlord u fiziološkom opsegu pH vrednosti pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost, te je u simulacijama korišćen pH-zavistan profil rastvorljivosti iz studije Stojković (2014). Vrednost efektivne permeabilnosti izračunata je u Simcyp®-u na osnovu permeabilnosti dobijene na Caco-



2 ćelijama u studiji Volpe (2004). Dobijena je relativno visoka vrednost efektivne permeabilnosti ( $1,98 \cdot 10^{-4}$  cm/s) za proksimalni deo tankog creva što je u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima. S obzirom da je u okviru studije u kojoj je korišćena hf-kapsula koja je dizajnirana tako da oslobađa sadržaj leka u tačno određenom delu GIT-a, pokazano da se ciprofloksacin dominantno apsorbuje u gornjim delovima intestinuma (uglavnom duodenum i jejunum) izračunata vrednost usvojena je za duodenum i jejunum, dok je vrednost u ostalim delovima GIT-a predviđena na osnovu *Simcyp*<sup>®</sup> *Parameter Estimation* opcije i iznosi  $0,1 \cdot 10^{-4}$  cm/s. Vrednost konstante precipitacije je predviđena na osnovu *Simcyp*<sup>®</sup> *Parameter Estimation* opcije i dobijena vrednost od  $0,0001\text{h}^{-1}$  ukazuje da se ne očekuje precipitacija ciprofloksacin-hidrohlorida. Volumen distribucije predviđen je u *Simcyp*<sup>®</sup>-u na osnovu potpunog PBPK modela distribucije i metode Rodgers i Rowland (metoda 2) i iznosi 1,4857 L/kg što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Drusano i sar, 1986). Simulacije su izvođene za reprezentativnog pojedinca *Sim-Healthy Volunteers* populacije.

Simulirani profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi na osnovu ulaznih parametara prikazanih u tabeli 90 u saglasnosti je sa *in vivo* profilom objavljenim u literaturi (Lettieri i sar, 1992) što je prikazano na slici 118.



Slika 118. Simulirani profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem u odnosu na *in vivo*

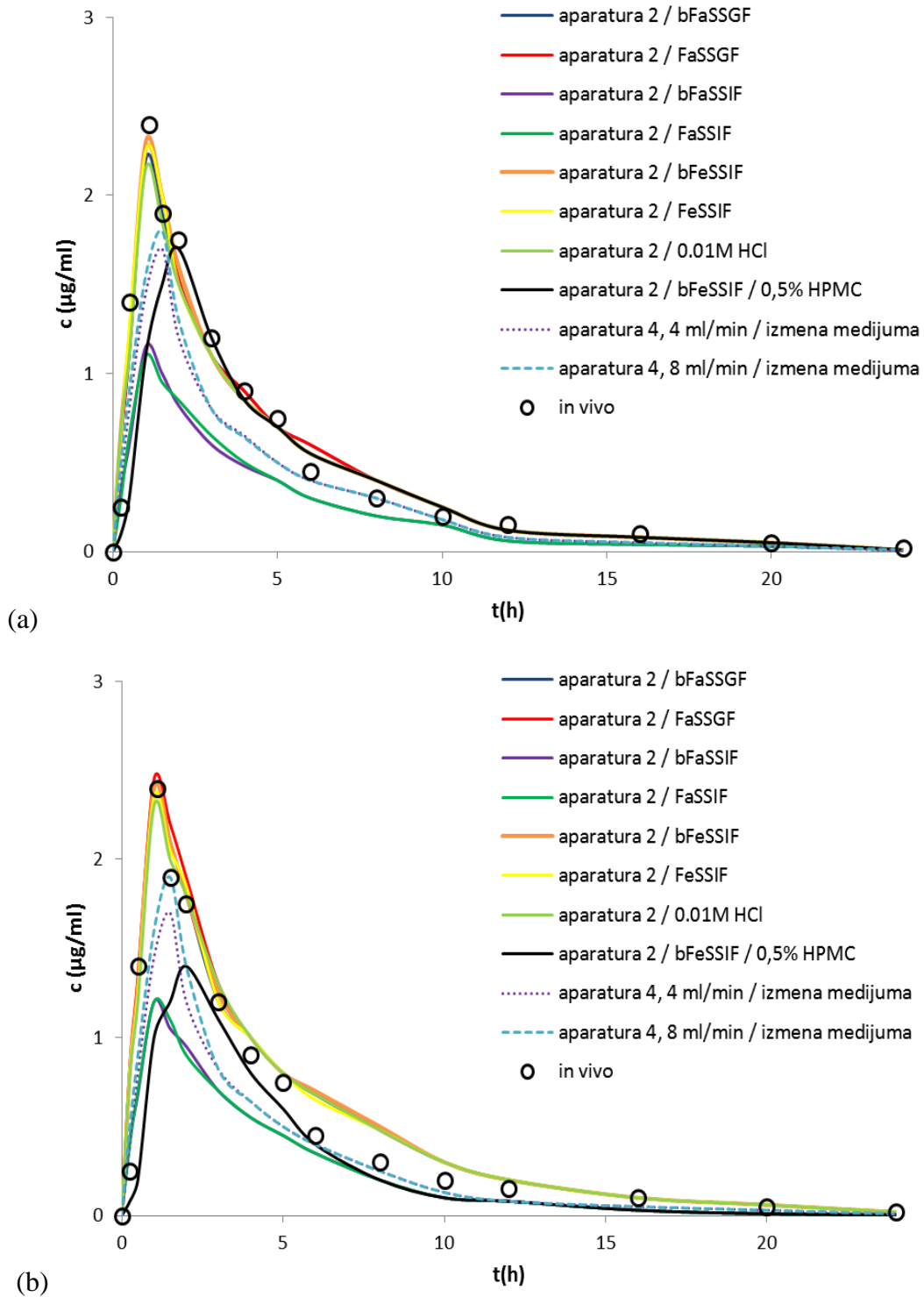
Tačnost predviđanja procenjena je izračunavanjem procenta greške predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$  i  $\text{PIK}_{0-t}$ ), prikazanih u tabeli 91. S obzirom da njihove vrednosti ne prelaze 10% model se smatra validiranim i kao takav korišćen je za dalja ispitivanja.

Tabela 91. Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajućih greški predviđanja za tablete sa trenutnim oslobađanjem ciprofloksacin-hidrohlorida

Farmakokinetički parametar	Stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	Greška predviđanja (%PE)
$C_{\max}$ (µg/ml)	2,40	2,25	6,25
$t_{\max}$ (h)	1,10	1,01	8,18
$\text{PIK}_{0-t}$ (µgh/ml)	9,95	10,15	2,01

## Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje

Da bi se ispitaio uticaj brzine rastvaranja na profil koncentracije lekovite supstance u plazmi, eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja korišćeni su kao ulazni podaci za simulacije. Simulirani profili simulirani prikazani su na slici 119a za preparat C1, odnosno 119b za preparat C2.



Slika 119. Simulirani profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi za: (a) preparat C1 i (b) preparat C2

Simulirani profili ukazuju da, ukoliko je brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta takva da je rastvoreno 85% lekovite supstance nakon 30 min ispitivanja, ona neće značajno uticati na profil koncentracije leka u plazmi. U slučaju nepotpunih profila brzine rastvaranja usled ograničene rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida koji je za oba preparata zabeležen u medijumima pH vrednosti 6,5 (bFaSSiF i FaSSiF), simulirani profili koncentracije leka u plazmi pokazuju značajno niže vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ . Može se uočiti da kada su profili brzine rastvaranja takvi da se očekuje potpuno rastvaranje ciprofloksacin-hidrohlorida, odnosno nema platoa u brzini rastvaranja (profili dobijeni u aparaturi sa lopaticom uz korišćene viskozno medijuma i profili dobijeni u protočnoj ćeliji), ali nije postignuto potpuno rastvaranje u toku prvih 60 min ispitivanja, simulirani profil koncentracije leka u plazmi pokazuju znatno niže vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ . Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa nalazima koji ukazuju da ciprofloksacin pokazuje apsorpcioni prozor u gornjim delovima tankog creva, te da udeo lekovite supstance koji se kasnije rastvara neće biti dostupan za apsorpciju.

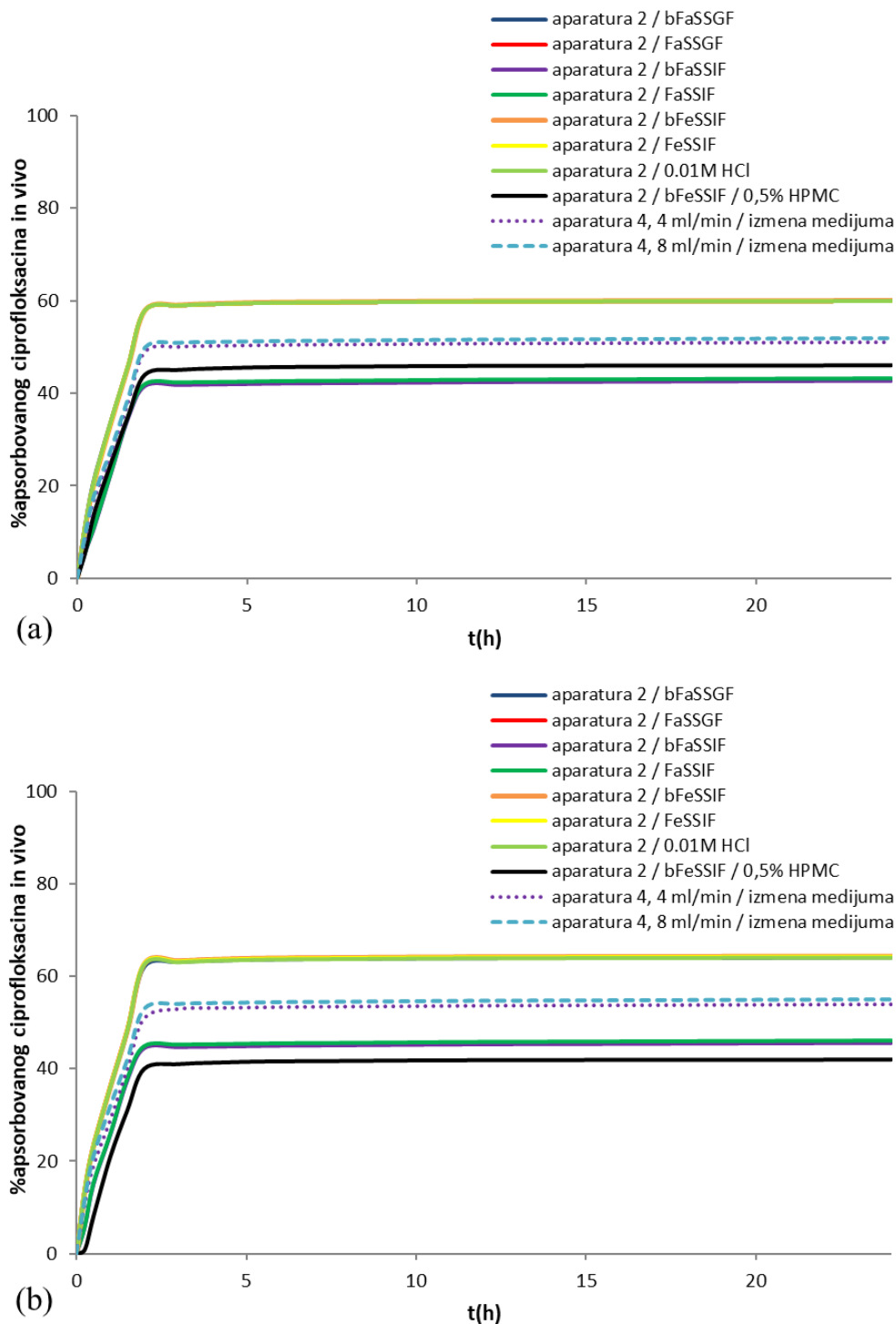
Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ) dobijene na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz preparata C1 i C2, kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 92. Prikazani rezultati ukazuju da je kod oba preparata najbolje slaganje simuliranog i stvarnog profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi dobijeno kada su kao ulazni podaci za simulacije korišćeni eksperimentalno određeni profili brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom i FeSSiF-om, odnosno odgovarajućem puferu bez surfaktanata kao medijumu.

Tabela 92. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta i odgovarajuće greške predviđanja za preparate C1 i C2

<b><i>In vitro</i> profil</b>		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
<b>Preparat C1</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	2,20	8,33	1,00	9,09	10,15	2,01
	FaSSGF	2,25	6,25	0,95	13,63	10,23	2,81
	bFaSSiF	1,15	52,08	1,05	4,54	5,65	43,21
	FaSSiF	1,10	54,16	1,00	9,09	5,43	45,42
	bFeSSiF	2,30	4,16	1,00	9,09	10,45	5,02
	FeSSiF	2,27	5,41	1,00	9,09	10,50	5,52
	0,01M HCl	2,15	10,41	1,00	9,09	10,30	3,51
	bFeSSiF/0,5% HPMC	1,50	37,50	1,45	31,81	7,85	21,10
Aparatura 4	4 ml/min	1,73	27,91	1,40	27,27	8,23	17,28
	8 ml/min	1,80	25,00	1,40	27,27	8,51	14,47
<b>Preparat C2</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	2,41	0,41	0,95	13,63	10,45	5,02
	FaSSGF	2,45	2,08	0,95	13,63	10,53	5,82
	bFaSSiF	1,21	49,58	1,05	4,54	5,78	41,90
	FaSSiF	1,23	48,75	1,05	4,54	5,86	41,10
	bFeSSiF	2,40	0,00	0,95	13,63	10,50	5,52
	FeSSiF	2,35	2,08	0,95	13,63	10,48	5,32
	0,01M HCl	2,32	3,33	0,95	13,63	10,23	2,81
	bFeSSiF/0,5% HPMC	1,41	41,25	1,50	36,36	7,02	29,44
Aparatura 4	4 ml/min	1,69	29,58	1,50	36,36	7,53	24,32
	8 ml/min	1,91	20,41	1,50	36,36	8,21	17,48
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>2,40</b>	<b>/</b>	<b>1,10</b>	<b>/</b>	<b>9,95</b>	<b>/</b>

## Identifikacija profila apsorpcije ciprofloksacina primenom Simcyp® gastrointestinalne simulacije

Simulacija procesa apsorpcije ciprofloksacina iz tableta sprovedena je korišćenjem validiranog modela GI simulacije. Cilj ovih ispitivanja bio je da se proceni mogućnost primene razvijenog *in silico* modela za identifikaciju *in vivo* input profila, kao i za uporednu analizu sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i gastrointestinalnom simulacijom korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa.



Slika 120. Simulirani profili apsorpcije ciprofloksacina na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja za: (a) preparat C1 i (b) preparat C2

Hipotetički *in vivo* profili apsorpcije ciprofloksacina iz tableta dobijeni GI simulacijom na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila brzine rastvaranja predstavljeni su na slici 120a za preparat C1, odnosno 120b za preparat C2. Može se uočiti da se apsorpcija ciprofloksacina odvija relativno brzo (u prvih 2 h ispitivanja), kao i da brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida određena *in vitro* ima značajnog uticaja na predviđeni obim apsorpcije za oba ispitivana preparata. Predviđeni obim apsorpcije kreće se između 52-65% (izuzev u slučaju kada su kao input korišćeni *in vitro* profili brzine rastvaranja u bFaSSIF, FaSSIF i viskoznom medijumu). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima o *in vivo* bioraspoloživosti ciprofloksacina.

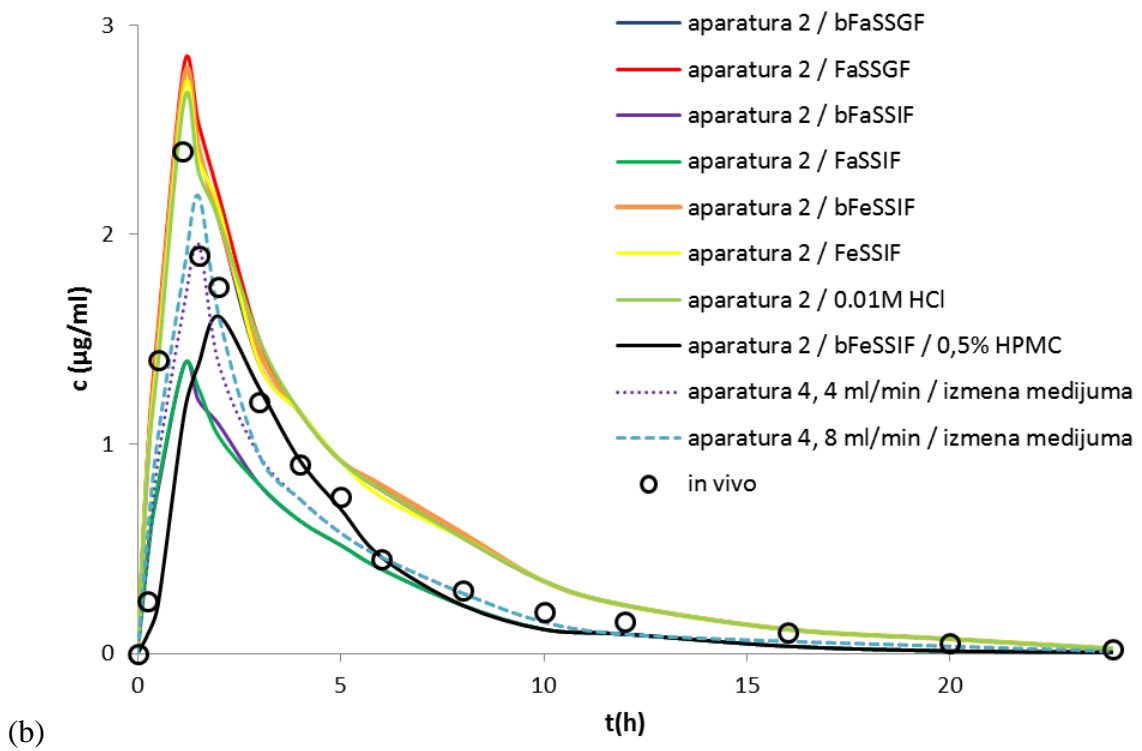
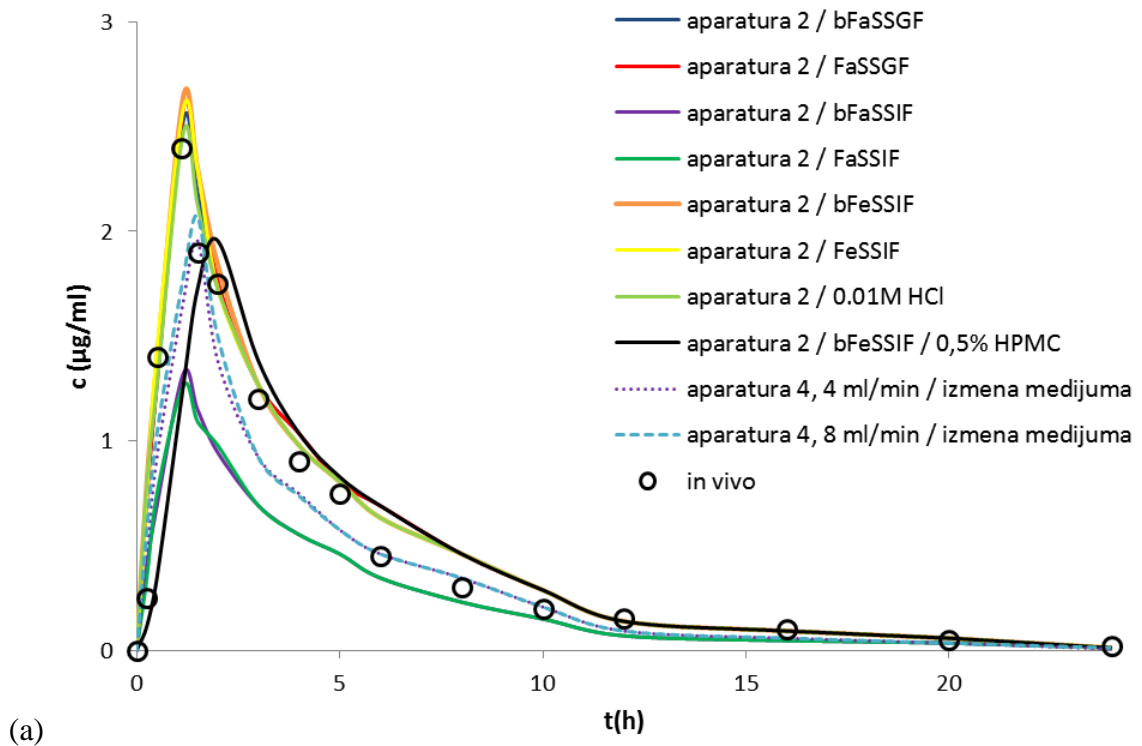
#### 4.10.5.2 Gastrointestinalna simulacija korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa

U daljem toku istraživanja iste vrednosti ulaznih parametara (u prikazane u tabeli 90) korišćene su u okviru komercijalno dostupnog GastroPlus™ (verzija 8.0; SimulationsPlus, Lancaster, California, SAD) programskog paketa.

Osnovna podešavanja u okviru GastroPlus™ programskog paketa nisu menjana prilikom izvođenja simulacija, izuzev vrednosti ASF faktora koji su optimizovani i u duodenumu i jejunumu imaju vrednost 2,8. ASF vrednosti u distalnim delovima intestinuma podešene su na 0 s obzirom da je pokazano da se ciprofloksacin apsorbuje isključivo u gornjim delovima tankog creva (Harder i sar, 1990). Volumen distribucije predviđen je korišćenjem PBPK modela i metode Rodgers i Rowland (kao i u slučaju Simcyp®-a) i dobijena je vrednost od 1,4795 L/kg što odgovara vrednosti od 1,4857 L/kg predviđenoj u Simcyp®-u. Kao i kod razvoja modela u Simcyp® programskom paketu, usvojena je pretpostavka da u GIT-u ne dolazi do precipitacije ciprofloksacin-hidrohlorida, pa je srednje vreme precipitacije podešeno na 10000 s, što odgovara konstanti precipitacije 0,0001 1/s koja je korišćena i u Simcyp®-u.

Simulirani profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi dobijeni GI simulacijom u GastroPlus™-u na osnovu profila brzine rastvaranja dobijenih pod različitim eksperimentalnim uslovima prikazani su na slici 121a za preparat C1, odnosno 121b za preparat C2. Vrednosti izabranih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ ), kao i odgovarajuće greške predviđanja prikazane su u tabeli 93. Može se uočiti da dobijeni profili u poređenju sa profilima dobijenim u Simcyp®-u pokazuju nešto više vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-t}$ . Ovakvi rezultati mogli bi se objasniti razlikama u vremenima zadržavanja u pojedinim delovima GI trakta u okviru ADAM i ACAT modela, gde je u okviru ACAT modela predviđeno nešto duže zadržavanje u gornjim delovima GI trakta (tabela 35). I u ovom slučaju potvrđen je značajan uticaj profila brzine rastvaranja primenjenih kao ulazni parametri za simulaciju apsorpcije. S obzirom da ciprofloksacin pokazuje apsorpcioni prozor u gornjim delovima GI trakta, duže zadržavanje objašnjava i veći predviđeni obim apsorpcije.

Analizom dobijenih profila može se uočiti da se pouzdanija predviđanja dobijaju korišćenjem *in vitro* profila kod kojih je 85% lekovite supstance rastvoreno u toku 30 min ispitivanja, a to su, u ovom slučaju, profili dobijeni u aparaturi sa lopaticom korišćenjem bFaSSGF, FaSSGF, bFeSSIF, FeSSIF i 0,01 M HCl kao medijuma.



Slika 121. Profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi simulirani korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja za: (a) preparat C1 i (b) preparat C2 i referentni *in vivo* uočeni profil

Tabela 93. Farmakokinetički parametri predviđeni korišćenjem GastroPlus™ programskog paketa na osnovu eksperimentalnih profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta, i odgovarajuće greške predviđanja za preparate C1 i C2.

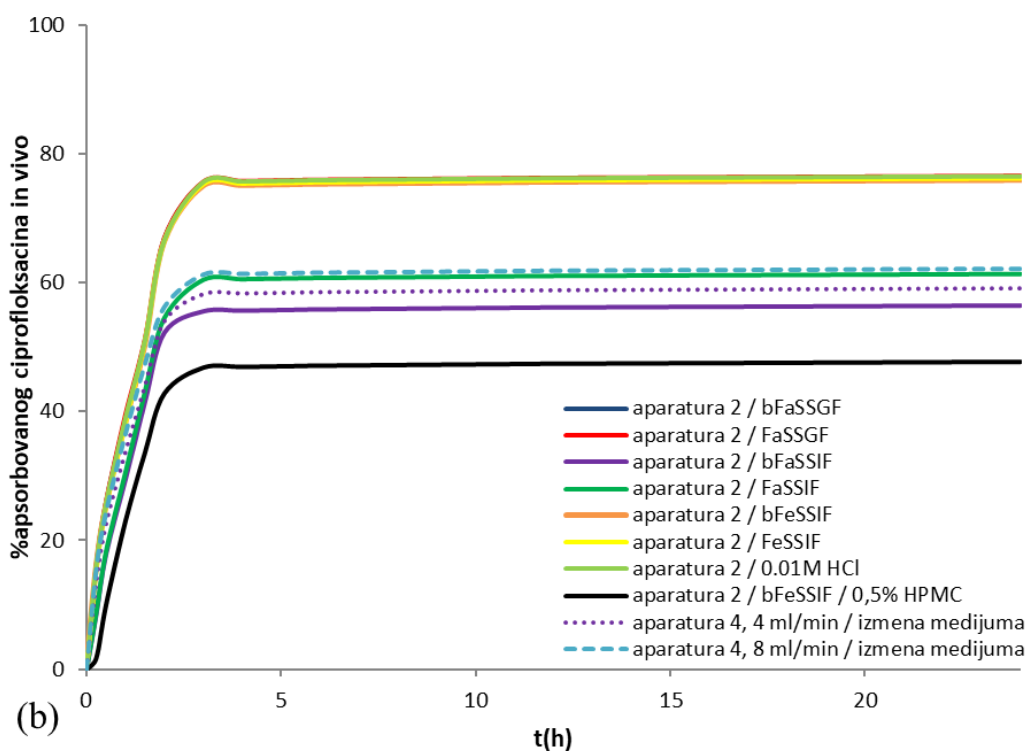
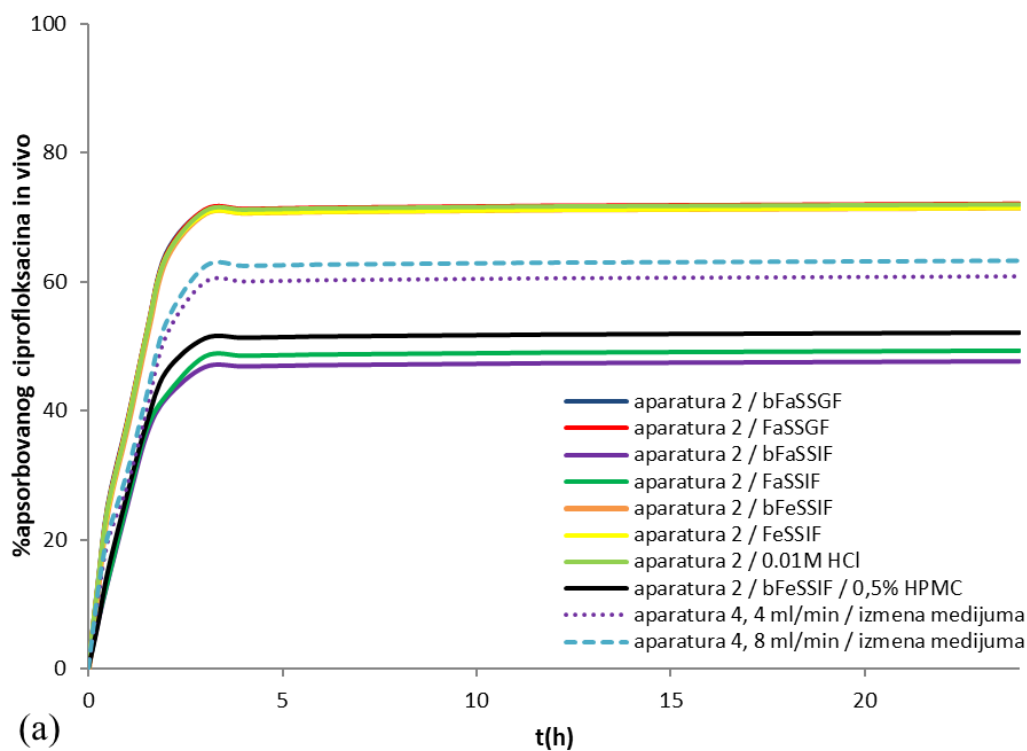
<b><i>In vitro</i> profil</b>		$C_{max}$	%PE	$t_{max}$	%PE	$PIK_{0-t}$	%PE
Uređaj	Medijum/protok	( $\mu\text{g/ml}$ )		(h)		( $\mu\text{gh/ml}$ )	
<b>Preparat C1</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	2,53	5,41	1,15	4,54	10,84	8,94
	FaSSGF	2,59	7,91	1,10	0,00	10,91	9,64
	bFaSSIF	1,32	45,00	1,20	9,09	6,32	36,48
	FaSSIF	1,26	47,50	1,20	9,09	6,25	37,18
	bFeSSIF	2,64	10,00	1,15	4,54	10,90	9,54
	FeSSIF	2,58	7,50	1,15	4,54	10,83	8,84
	0,01M HCl	2,47	2,91	1,15	4,54	10,75	8,04
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,95	18,75	1,65	50,00	9,20	7,53
Aparatura 4	4 ml/min	1,95	18,75	1,50	36,36	9,78	1,70
	8 ml/min	2,07	18,75	1,50	36,36	9,89	0,60
<b>Preparat C2</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	2,76	15,00	1,10	0,00	11,75	18,09
	FaSSGF	2,81	17,08	1,10	0,00	12,05	21,10
	bFaSSIF	1,38	42,50	1,15	4,54	6,59	33,76
	FaSSIF	1,39	42,08	1,15	4,54	6,75	32,16
	bFeSSIF	2,76	15,00	1,05	4,54	11,98	20,40
	FeSSIF	2,71	12,91	1,05	4,54	11,80	18,59
	0,01M HCl	2,64	10,00	1,05	4,54	11,87	19,29
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,61	32,91	1,70	54,54	8,57	13,89
Aparatura 4	4 ml/min	1,97	17,91	1,55	40,90	9,25	7,03
	8 ml/min	2,18	9,16	1,55	40,90	9,48	4,72
<b><i>In vivo</i> profil</b>		<b>2,40</b>	<b>/</b>	<b>1,10</b>	<b>/</b>	<b>9,95</b>	<b>/</b>

### Identifikacija profila apsorpcije ciprofloksacina primenom GastroPlus™ gastrointestinalne simulacije

Cilj ovih ispitivanja bio je da se proceni mogućnost primene GastroPlus™ GI simulacije za identifikaciju *in vivo* inputa, kao i uporedna analiza dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim konvencionalnom farmakokinetičkom analizom i Simcyp® GI simulacijom.

Simulirani profili apsorpcije ciprofloksacina iz tableta dobijeni GastroPlus™ GI simulacijom prikazani su na slici 122a za preparat C1, odnosno 122b za preparat C2. Može se uočiti značajno veći predviđeni obim apsorpcije (oko 70%) u odnosu na rezultate dobijene u Simcyp®-u. Predviđeni obim apsorpcije u saglasnosti je sa literaturnim podacima o biološkoj raspoloživosti ciprofloksacina iz tableta.

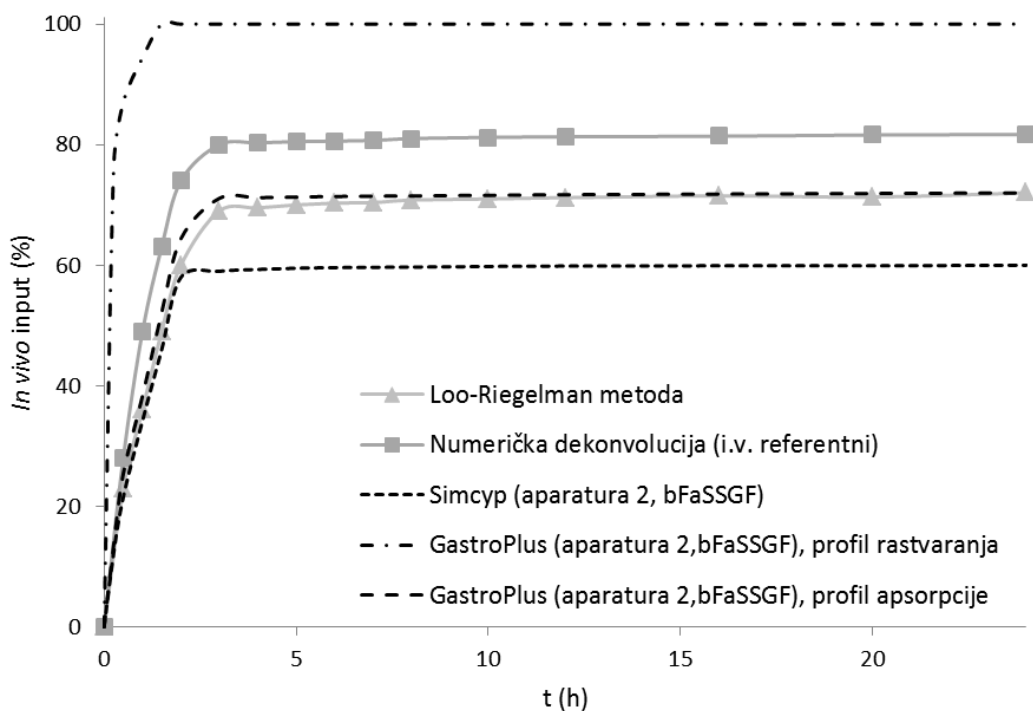
Rezultati dobijeni GI simulacijom u saglasnosti su sa rezultatima iz studija Stojković (2014) i Hansmann i sar. (2018). Rastvorljivost i permeabilnost prepoznati su kao kritični faktori koji utiču na apsorpciju ciprofloksacina ali *in silico* simulacije ukazuju da *in vivo* lekovita supstanca pokazuje i visoku rastvorljivost i visoku permeabilnost, i da ukoliko brzina rastvaranja nije ograničavajući faktor postiže se brza i potpuna apsorpcija ciprofloksacina. Hansmann i sar. (2018) su pokazali da se adekvatna predviđanja izabranih farmakokinetičkih parametara dobijaju uz pretpostavku da *in vivo* ne dolazi do precipitacije ciprofloksacin-hidrohlorida. Rezultati PBBM modelovanja su takođe pokazali značajan uticaj profila brzine rastvaranja na profil apsorpcije, odnosno profil koncentracije lekovite supstance u plazmi. Stojković (2014) je pokazala da se apsorpcija ciprofloksacina dominantno odvija u proksimalnom delu tankog creva.



Slika 122. Profili apsorpcije ciprofloksacina dobijeni GastroPlus™ GI simulacijom: (a) preparat C1 i (b) preparat C2

Uporednom analizom *in vivo* input profila dobijenih različitim metodama dekonvolucije uočavaju se određene razlike, pre svega u pogledu predviđenog obima apsorpcije, dok je brzina apsorpcije slična i ukazuje da se apsorpcija odvija u toku prvih 2 sata, odnosno u proksimalnom delu tankog creva (slika 123). I pored uočenih razlika, dobijene vrednosti (58-82%) nalaze se u opsegu vrednosti uočenih *in vivo*.





Slika 123. Uporedni prikaz *in vivo* input profila ciprofloksacina dobijenih različitim metodama dekonvolucije (preparat C1)

#### 4.10.6 *In vitro-in vivo* korelacija

##### Dekonvolucionni pristup

U cilju uspostavljanja kvantitativne korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka, hipotetički input profili izračunati metodom konvencionalne farmakokinetičke analize i profili predviđeni GI simulacijom korišćenjem Simcyp® i GastroPlus™ programskih paketa analizirani su u odnosu na *in vitro* profile brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz ispitivanih preparata dobijene pod različitim eksperimentalnim uslovima.

S obzirom da kod preparata sa trenutnim oslobađanjem postoji velika razlika u vremenima rastvaranja lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*, vremenska skala koja prikazuje *in vitro* podatke korigovana je faktorom korekcije vremenske skale, TS. Hipotetički input profili dobijeni primenom različitih dekonvolucionih metoda, kao i eksperimentalni profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta analizirani su korišćenjem Weibull-ove distribucije. Vrednosti TS izračunati su kao odnos  $\tau_{d\text{vivo}}$  i  $\tau_{d\text{vitro}}$  (tabela 94). Može se uočiti da se vrednosti TS dobijene za različite profile međusobno znatno razlikuju i kreću u opsegu 0,12 do 125.

Statistički parametri dobijeni linearnom regresionom analizom za preparate C1 i C2 nakon korekcije vremenske ose prikazani su u tabeli 95. Zanimljivo je da je nivo A IVIVK dobijen za sve eksperimentalno dobijene *in vitro* profile izuzev onih dobijenih u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje bFaSSIF, odnosno FaSSIF kao medijuma u odnosu na *in vivo* profil rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida koji je predviđen u GastroPlus™-u.

Tabela 94. Parametri Weibull-ove distribucije *in vitro* profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidroklorida, kao i odgovarajući TS faktori za preparate C1 i C2

<i>In vitro</i> profil		TS					
Uređaj	Medijum/ protok	$\tau_a$ (h)	$\beta$	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolu- cija	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
<b>Preparat C1</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	0,10	0,37	12,50	10,40	10,30	11,40
	FaSSGF	0,10	0,55	12,50	10,40	10,30	11,40
	bFaSSIF	0,06	2,77	20,83	17,33	17,17	19,00
	FaSSIF	0,01	0,46	125,00	104,00	103,00	114,00
	bFeSSIF	0,18	0,62	6,94	5,78	5,72	6,33
	FeSSIF	0,30	0,57	4,17	3,47	3,43	3,80
	0,01M HCl	0,13	0,74	9,62	8,00	7,92	8,77
	bFeSSIF/0,5%HPMC	0,45	1,86	2,78	2,31	2,29	2,53
Aparatura 4	4ml/min	0,83	0,53	1,51	1,25	1,24	1,37
	8ml/min	0,65	0,59	1,92	1,60	1,58	1,75
<b>Preparat C2</b>							
Aparatura 2	bFaSSGF	0,11	1,67	11,36	9,45	9,36	10,36
	FaSSGF	0,13	1,17	9,62	8,00	7,92	8,77
	bFaSSIF	0,12	1,99	10,42	8,67	8,58	9,50
	FaSSIF	0,14	2,10	8,93	7,43	7,36	8,14
	bFeSSIF	0,19	1,29	6,58	5,47	5,42	6,00
	FeSSIF	0,16	1,41	7,81	6,50	6,44	7,13
	0,01M HCl	0,11	1,56	11,36	9,45	9,36	10,36
	bFeSSIF/0,5%HPMC	1,21	2,18	1,03	0,86	0,85	0,94
Aparatura 4	4ml/min	0,67	0,44	1,87	1,55	1,54	1,70
	8ml/min	0,43	0,48	2,91	2,42	2,40	2,65

Tabela 95. Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije za preparate C1 i C2 (dekonvolucioni pristup)

In vitro input/ in vivo input		Nagib pravca/ koeficijent korelacije	Loo- Riegelman metoda	Numerička dekonvolucija	Simcyp® simulacija	GastroPlus™ simulacija
Uređaj	Medijum/protok					
<b>Preparat C1</b>						
Aparatura 2	bFaSSGF	a	0,6752	0,7528	0,6407	0,7701
		r	0,9652	0,9587	0,9697	0,9710
	FaSSGF	a	0,6662	0,7366	0,6328	0,7662
		r	0,9628	0,9530	0,9738	0,9776
	bFaSSIF	a	1,2429	1,4139	1,2086	1,4322
		r	0,9809	0,9738	0,9881	0,9889
	FaSSIF	a	0,7301	0,7816	0,7385	0,9017
		r	0,6792	0,6671	0,7505	0,7535
	bFeSSIF	a	0,6576	0,7499	0,6389	0,7651
		r	0,9637	0,9628	0,9750	0,9785
	FeSSIF	a	0,7022	0,8016	0,6702	0,7980
		r	0,9865	0,9847	0,9771	0,9825
	0,01M HCl	a	0,6424	0,7177	0,6175	0,4410
		r	0,9619	0,9533	0,9767	0,9815
bFeSSIF/0,5% HPMC	a	0,5127	0,5790	0,5197	0,6195	
	r	0,9247	0,9149	0,9755	0,9785	
Aparatura 4	4 ml/min	a	0,6889	0,7738	0,6570	0,8044
		r	0,9762	0,9738	0,9826	0,9595
	8 ml/min	a	0,6633	0,7644	0,6523	0,7726
		r	0,9769	0,9768	0,9889	0,9920
<b>Preparat C2</b>						
Aparatura 2	bFaSSGF	a	0,5950	0,6708	0,5837	0,6967
		r	0,9682	0,9598	0,9923	0,9938
	FaSSGF	a	0,6029	0,6804	0,5908	0,7825
		r	0,9701	0,9625	0,9922	0,9788
	bFaSSIF	a	0,8742	1,6502	0,8759	1,5249
		r	0,9674	0,9715	0,9894	0,9061
	FaSSIF	a	0,8449	1,5696	0,7976	1,4544
		r	0,9399	0,9815	0,9612	0,9141
	bFeSSIF	a	0,5957	0,7552	0,5846	0,7000
		r	0,9683	0,9657	0,9923	0,9930
	FeSSIF	a	0,5834	0,7074	0,5717	0,6818
		r	0,9619	0,9420	0,9879	0,9901
	0,01M HCl	a	0,6126	0,6934	0,5991	0,7315
		r	0,9679	0,9389	0,9919	0,9775
bFeSSIF/0,5% HPMC	a	0,5373	0,7728	0,5252	0,7379	
	r	0,9624	0,9927	0,9777	0,9520	
Aparatura 4	4 ml/min	a	0,6849	0,7771	0,6617	0,7904
		r	0,9704	0,9637	0,9748	0,9820
	8 ml/min	a	0,7368	0,7529	0,6409	0,7665
		r	0,9520	0,9615	0,9725	0,9769

a – nagib regresione prave; r – koeficijent korelacije

## Konvolucioni pristup

U konvolucionom pristupu uspostavljanju IVIVK, profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi predviđeni primenom GI simulacije u Simcyp® i GastroPlus™ programskim paketima na osnovu različitih *in vitro* profila brzine rastvaranja, analizirani su u odnosu na srednje farmakokinetičke profile uočene *in vivo*. Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 96 ukazuju na visok nivo IVIVK analiziranih setova podataka.

Tabela 96. Statistički *parametri in vitro-in vivo* korelacije za preparate C1 i C2 (konvolucioni pristup)

Uređaj	<i>In vitro</i> profil	Simcyp® simulacija		GastroPlus™ simulacija	
	Medijum/protok	a	r	a	r
<b>Preparat C1</b>					
Aparatura 2	bFaSSGF	1,0993	0,9815	0,9559	0,9926
	FaSSGF	1,0658	0,9818	0,9268	0,9918
	bFaSSIF	2,0793	0,9834	1,8038	0,9937
	FaSSIF	2,1165	0,9889	1,8512	0,9939
	bFeSSIF	1,0440	0,9825	0,9079	0,9922
	FeSSIF	1,0631	0,9838	0,9244	0,9928
	0,01M HCl	1,1190	0,9800	0,9731	0,9899
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,1738	0,8518	1,0111	0,9235
Aparatura 4	4 ml/min	1,3951	0,9665	1,2131	0,9830
	8 ml/min	1,3036	0,9647	1,1336	0,9827
<b>Preparat C2</b>					
Aparatura 2	bFaSSGF	0,9921	0,9807	0,8627	0,9817
	FaSSGF	0,9510	0,9797	0,8269	0,9923
	bFaSSIF	1,8871	0,9777	1,6410	0,9897
	FaSSIF	1,8813	0,9800	1,6359	0,9899
	bFeSSIF	0,9908	0,9806	0,8616	0,9912
	FeSSIF	1,0027	0,9788	0,8719	0,9895
	0,01M HCl	1,0222	0,9779	0,8889	0,9889
	bFeSSIF/0,5% HPMC	1,3426	0,8572	1,1675	0,9268
Aparatura 4	4 ml/min	1,3849	0,9675	1,2043	0,9838
	8 ml/min	1,2278	0,9623	1,0677	0,9819

a – nagib regresione prave; r – koeficijent korelacije

Najviši nivo korelacije, opisan vrednošću koeficijenta korelacije većim od 0,95 i nagibom regresione prave blizu jedinice za oba ispitivana preparata, dobijen je za *in vitro* eksperimentalne uslove u kojima su korišćeni FaSSGF i FeSSIF, kao i njihovi analozi bez surfaktanata u aparaturi sa lopaticom što ukazuje da bi se ovi eksperimentalni uslovi mogli koristiti kao bioprediktivni za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz film tableta. Rezultati sprovedenih simulacija su pokazali da nema značajnog uticaja brzine rastvaranja na predviđeni profil apsorpcije ciprofloksacina *in vivo* ukoliko profil brzine rastvaranja odgovara brzom rastvaranju, odnosno ukoliko je više od 85% ciprofloksacin-hidrohlorida rastvoreno nakon 30 min.

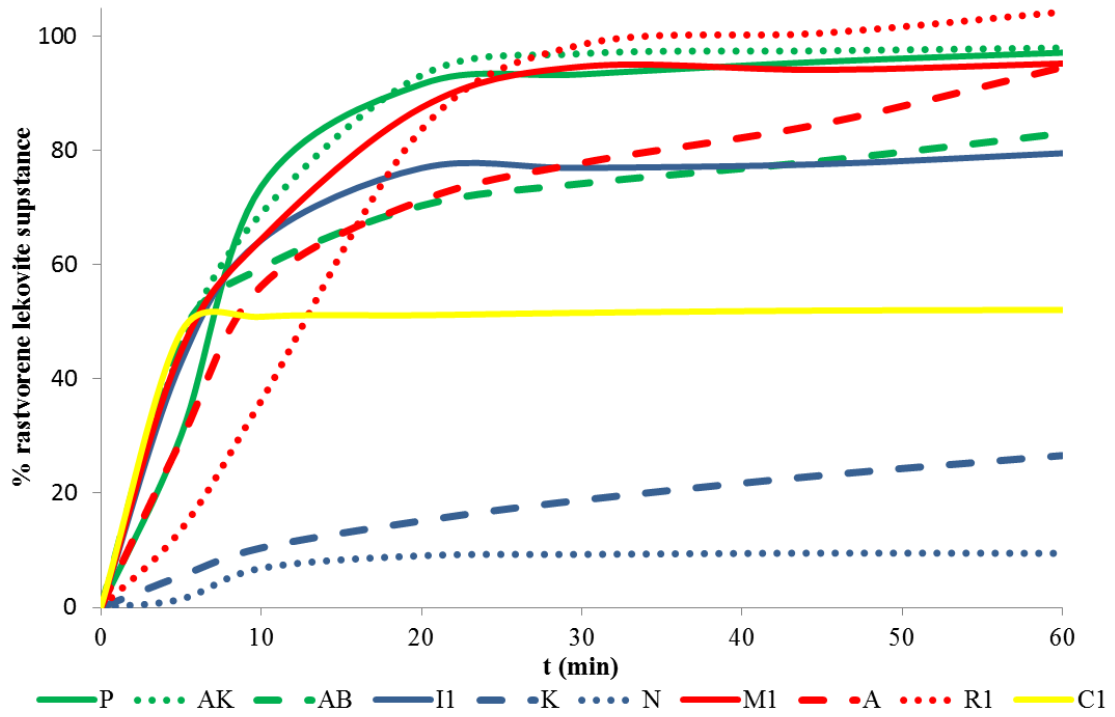
## 5. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOBIJENIH ZA RAZLIČITE MODEL SUPSTANCE

U okviru ovog poglavlja, uporedo su prikazani i analizirani: (i) rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta sa trenutnim oslobađanjem dobijeni pri izabranim, bioprediktivnim, eksperimentalnim uslovima; (ii) hipotetički *in vivo* input profili dobijeni primenom različitih metoda dekonvolucije; (iii) rezultati dobijeni ispitivanjem korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka i (iv) podaci o biofarmaceutskim karakteristikama ispitivanih model lekovitih supstanci, uključujući predlog klinički značajnih specifikacija za brzinu rastvaranja ispitivanih lekovitih supstanci.

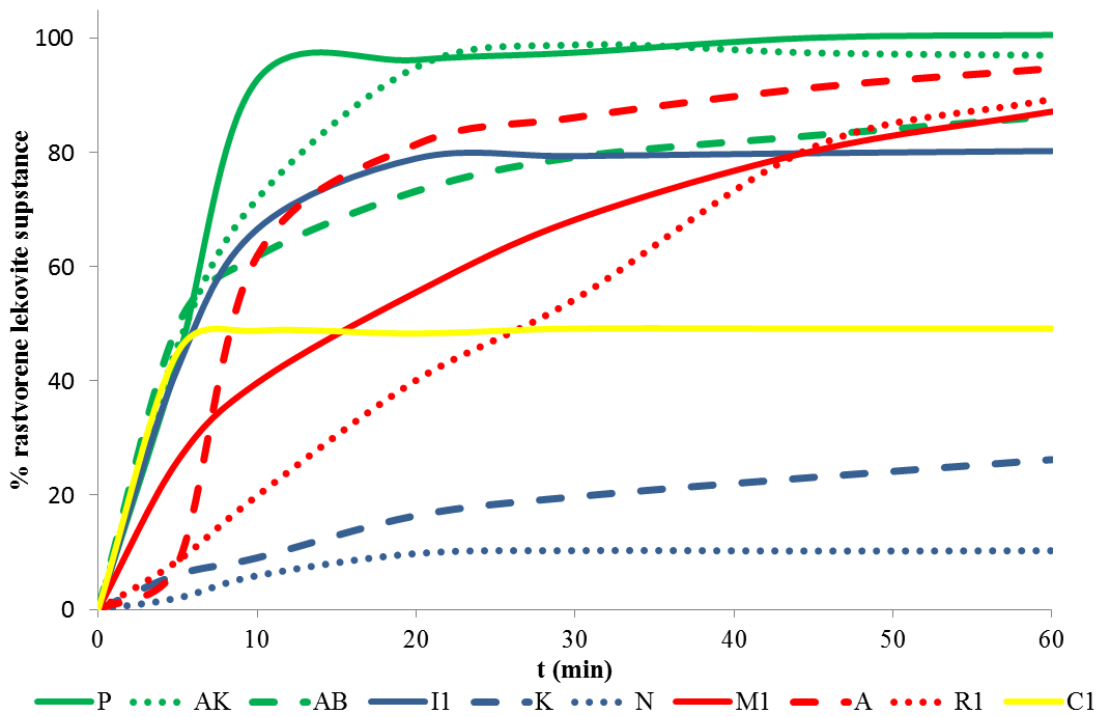
### 5.1 *In vitro* brzina rastvaranja lekovite supstance iz tableta

Uporednom analizom rezultata dobijenih za različite model lekovite supstance uočeno je da je kod većine ispitivanih supstanci (osim karbamazepina, nimesulida i ciprofloksacin-hidrohlorida) gotovo kompletno rastvaranje ispitivanih model supstanci iz tableta postignuto u aparaturi sa lopaticom pri brzini od 50 rpm, uz primenu FaSSIF (pH 6,5) kao medijuma. Dodatak površinski aktivnih supstanci uglavnom nije ispoljio značajan uticaj i slični profili uočeni su i u odgovarajućem medijumu bez surfaktanata (bFaSSIF). S obzirom na prednosti koje medijumi bez dodatka surfaktanata imaju u pogledu jednostavnosti pripreme, poboljšane stabilnosti i cene, kao referentni medijum izabran je bFaSSIF. Na slici 124 prikazani su rezultati ispitivanja svih deset model supstanci u aparaturi sa lopaticom pri brzini od 50 rpm, uz primenu FaSSIF i bFaSSIF medijumima.

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja *in vitro* u bFaSSIF medijumu pokazuju da je u slučaju paracetamola i acetilsalicilne kiseline postignuto „veoma brzo rastvaranje“ (više od 85% lekovite supstance rastvoreno nakon 15 minuta). Rastvaranje amlodipin-besilata, ibuprofena i ciprofloksacin-hidrohlorida je takođe bilo veoma brzo, ali nepotpuno – ukupna količina rastvorene lekovite supstance bila je oko 80% u slučaju amlodipin-besilata i ibuprofena, odnosno oko 50% u slučaju ciprofloksacin-hidrohlorida. U slučaju atenolola, rastvaranje je bilo odloženo u toku vremenskog intervala od 5 minuta, nakon čega je postignuto relativno brzo i potpuno rastvaranje ispitivane lekovite supstance. U slučaju ranitidin-hidrohlorida i metformin-hidrohlorida, rastvaranje lekovite supstance iz tableta bilo je nešto sporije, pri čemu je oko 80% lekovite supstance rastvoreno nakon 45 minuta. U slučaju karbamazepina i nimesulida uočeno je veoma sporo i nepotpuno rastvaranje, pri čemu je količina rastvorene supstance nakon 60 minuta ispitivanja bila oko 25, odnosno 10%, redom.



(a)

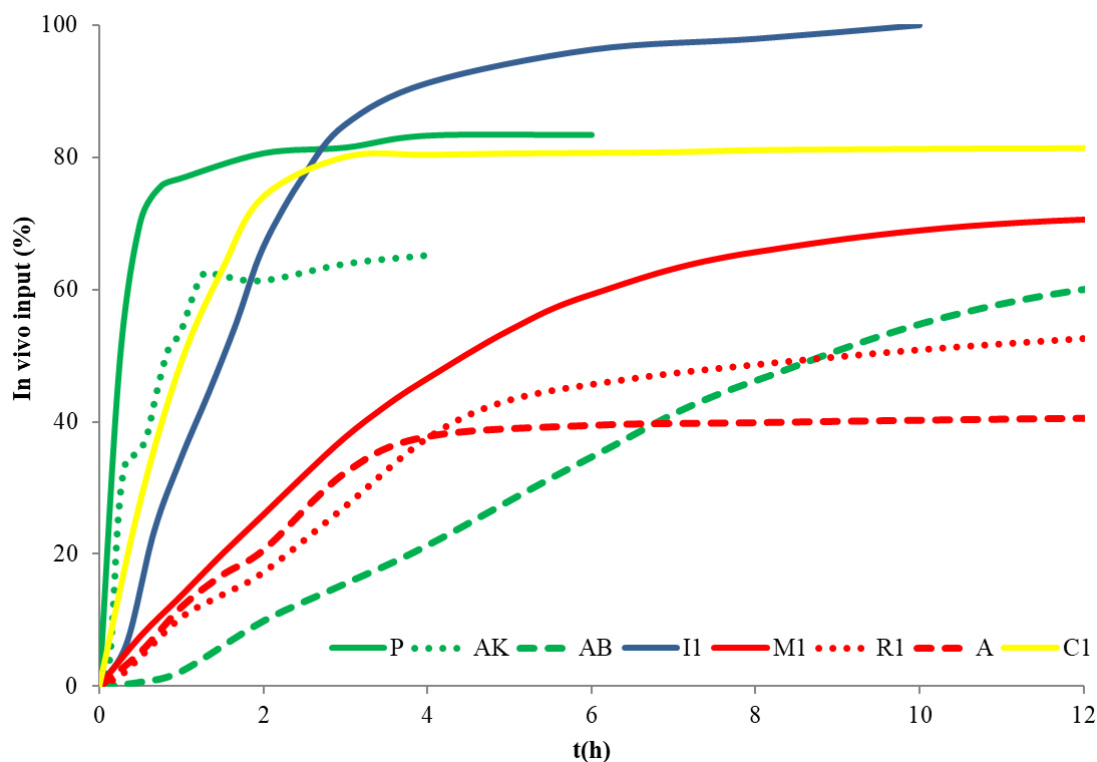


(b)

Slika 124. Profili brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz ispitivanih uzoraka tableta sa trenutnim oslobađanjem u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje: (a) FaSSIF; (b) bFaSSIF-a kao medijuma

## 5.2 Hipotetički *in vivo* input profili

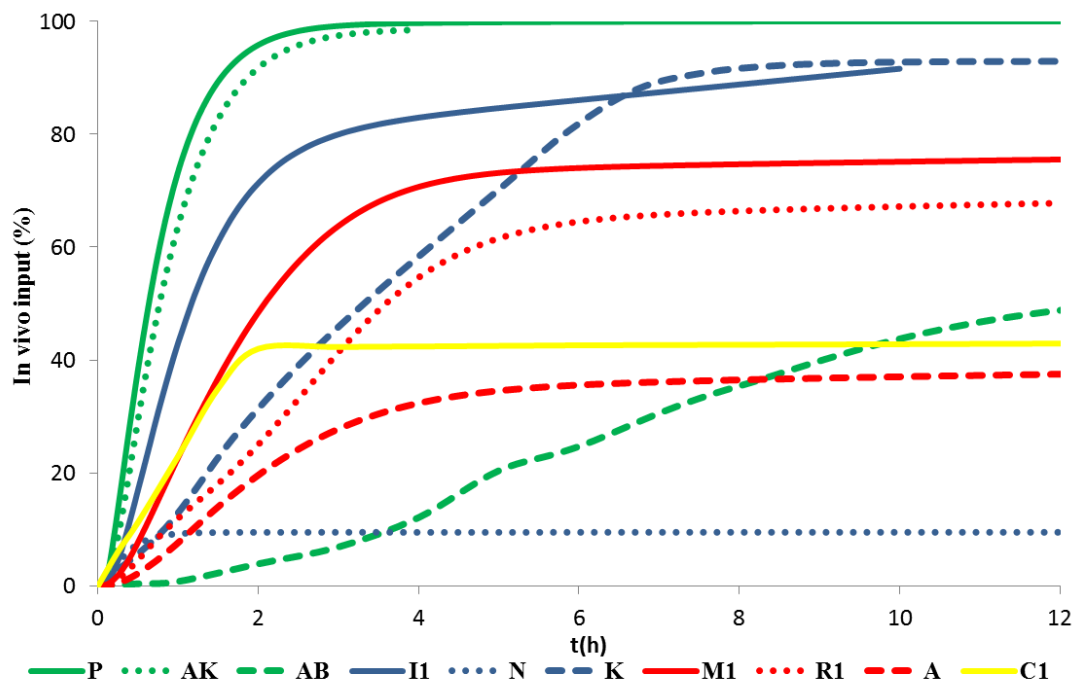
Primenom različitih metoda dekonvolucije izračunati su hipotetički *in vivo* input profili apsorpcije ili rastvaranja lekovite supstance u organizmu. S obzirom da je za većinu ispitivanih supstanci (osim nimesulida i karbamazepina) bilo moguće primeniti metodu numeričke dekonvolucije, odgovarajući rezultati dobijeni na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske primene kao težinske funkcije prikazani su na slici 125.



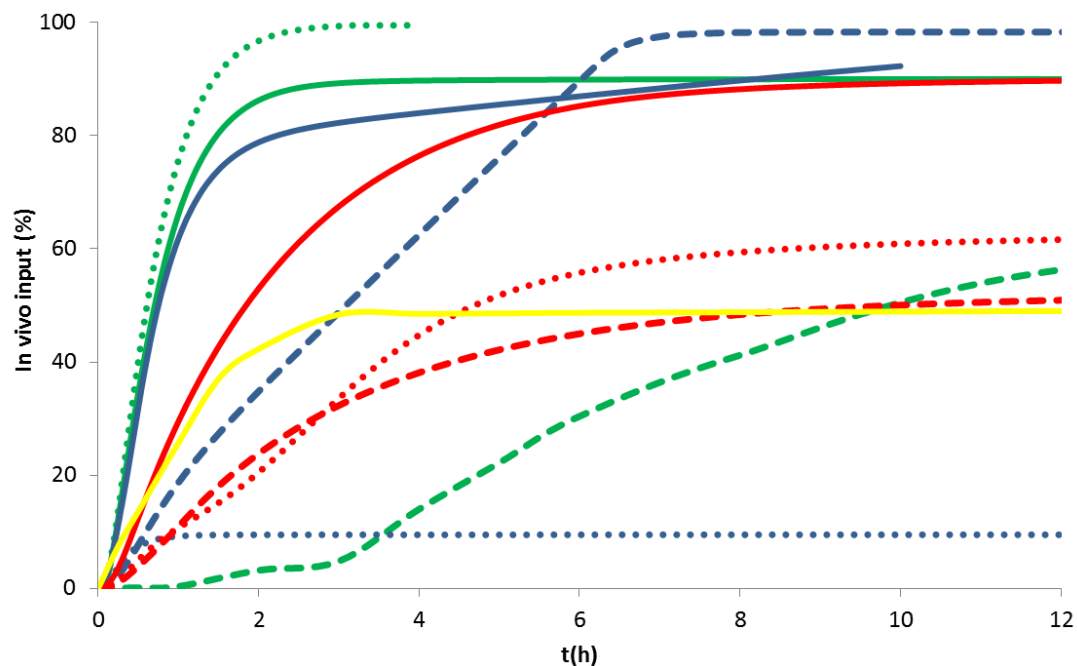
Slika 125. Hipotetički *in vivo* input profili ispitivanih model supstanci dobijeni numeričkom dekonvolucijom

Dobijeni rezultati ukazuju da se u slučaju paracetamola, acetilsalicilne kiseline, ciprofloksacina i ibuprofena apsorpcija leka odvija brzo, u periodu od dva sata nakon primene. Apсорpcija metformina, ranitidina i atenolola je nepotpuna i odvija se znatno sporije, dostižući plato u periodu od oko četiri do šest sati (ili duže) nakon primene leka. Amlodipin pokazuje najsporiju apсорpciju, koja se odvija kinetikom bliskoj kinetici nultog reda, pri čemu je nakon šest sati apсорbovano oko 30, a nakon 12 sati oko 60% primenjene doze.

Predviđeni profili apсорpcije ispitivanih supstanci dobijeni Simcyp® i GastroPlus™ simulacijama prikazani su na slici 126 (kao referentni, izabrani su profili dobijeni na osnovu brzine rastvaranja lekovite supstance dobijeni *in vitro* u aparaturi sa lopaticom, uz bFaSSIF kao medijum).



(a)



(b)

Slika 126. Hipotetički *in vivo* input profili ispitivanih model supstanci dobijeni: (a) Simcyp® i (b) GastroPlus™ GI simulacijom na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom uz korišćenje bFaSSiF-a kao medijuma

Iako su prisutne izvesne razlike, pre svega u pogledu obima apsorpcije, profili dobijeni Simcyp® i GastroPlus™ simulacijama su, generalno, bili međusobno slični. Najbržu apsorpciju pokazuju paracetamol, acetilsalicilna kiselina i ibuprofen, pri čemu je profil apsorpcije ibuprofena predviđen primenom Simcyp® simulacije bio nešto sporiji u odnosu na paracetamol i



acetilsalicilnu kiselinu, dok su profili dobijeni GastroPlus™ simulacijama bili gotovo podudarni (uz izvesne razlike u pogledu ukupne količine apsorbovanog leka). Profili apsorpcije metformina i ciprofloksacina su bili podudarni u pogledu brzine, ali je ukupna količina apsorbovanog leka u slučaju metformina bila oko 80%, dok je u slučaju ciprofloksacina bila oko 40-50%. Predviđene brzine apsorpcije karbamazepina i nimesulida bile su nešto sporije u odnosu na metformin i ciprofloksacin, pri čemu je, usled veoma ograničenog rastvaranja u bFaSSIF-u, predviđena ukupna količina apsorbovanog nimesulida bila svega oko 10%, dok je u slučaju karbamazepina, nakon šest sati apsorbovana celokupna primenjena doza. Brzina apsorpcije ranitidina i atenolola je bila slična, pri čemu je obim apsorpcije za ranitidin bio oko 70, odnosno oko 60%, a za atenolol oko 40, odnosno oko 50% za profile dobijene primenom Simcyp®, odnosno GastroPlus™ simulacije, redom. Profili ukazuju da najsporiju apsorpciju, uz obim apsorpcije od oko 40-50% nakon 12 sati pokazuje amlodipin. Ovakav profil apsorpcije nije u saglasnosti sa visokom permeabilnošću amlodipina, a takođe nije realno da se apsorpcija odvija tokom 60 h koliko je predviđeno rezultatima simulacija. Može se pretpostaviti da s obzirom da se radi o lekovitoj supstanci sa veoma velikim volumenom distribucije, gde lekovita supstanca odmah po dospevanju u sistemsku cirkulaciju prelazi u periferna tkiva, koncentracija amlodipina u plazmi pre svega zavisi od raspodele lekovite supstance između perifernih tkiva i sistemske cirkulacije. Očekuje se da je *in vivo* apsorpcija amlodipina iz GIT-a relativno brza, ali da lekovita supstanca brzo prelazi u periferna tkiva što onemogućava adekvatno predviđanje apsorpcije na osnovu koncentracije lekovite supstance u plazmi.

Rezultati dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije bili su, generalno, u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom numeričke dekonvolucije. Najveća razlika između rezultata dobijenih primenom različitih metoda dekonvolucije uočava se u slučaju ciprofloksacina, za koji je primenom numeričke dekonvolucije dobijen profil koji ukazuje na izuzetno brzu i gotovo potpunu apsorpciju (oko 80% apsorbovano nakon 3 h), dok je GI simulacijama predviđena maksimalna apsorbovana količina leka od oko 40%. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim ispitivanjem brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta, gde je ukupna količina rastvorene lekovite supstance u FaSSIF i bFaSSIF bila oko 40% i ukazuju da bi u ovom slučaju, kao bioprediktivne medijume trebalo razmotriti FaSSGF, bFaSSGF ili 0,01 M HCl.

### **5.3 *In vitro-in vivo* korelacija**

Iako se generalno smatra da u slučaju preparata sa trenutnim oslobađanjem, naročito kada se radi o lekovitim supstancama koje pokazuju visoku rastvorljivost, nije moguće postići visok stepen *in vitro-in vivo* korelacije, dobijeni rezultati pokazuju da je u većini slučajeva, uz primenu odgovarajuće vrednosti faktora skaliranja vremenske ose *in vitro* podataka, bilo moguće uspostaviti IVIVK nivoa A.

### **5.4 Biofarmaceutske karakteristike ispitivanih model supstanci**

U tabeli 97 prikazane su uporedo vrednosti različitih parametara od značaja za biofarmaceutsku karakterizaciju ispitivanih lekovitih supstanci kako bi se sagledao njihov značaj za mehanističko razumevanje procesa apsorpcije i biofarmaceutsku klasifikaciju lekova.

Ispitivani set lekovitih supstanci izbalansiran je u pogledu broja supstanci koje pripadaju različitim klasama u okviru BCS i BDDCS sistema klasifikacije – tri supstance pripadaju klasi 1, tri klasi 2, tri klasi 3 i jedna supstanca (ciprofloksacin-hidrohlorid) koja pokazuje granične vrednosti rastvorljivosti i permeabilnosti, usled čega je različiti autori različito klasifikuju.

Tabela 97. Osnovne biofarmaceutske karakteristike ispitivanih model supstanci

<i>Model supstanca</i>	<i>BCS klasa</i>	<i>BDDCS klasa*</i>	<i>Do</i>	<i>Peff (<math>\cdot 10^{-4}</math> cm/s)**</i>	<i>Fa (%)***</i>	<i>t<sub>1/2</sub> (h)</i>	<i>D<sub>80%</sub> (min)</i>	<i>TS****</i>	<i>Klinički relevantna specifikacija</i>
<b>Paracetamol</b>	1/3	1	0,08	4,0	85	1,0-3,0	7	8,70 (0,17-9,40)	>85% za 45min
<b>Acetilsalicilna kiselina</b>	1/3	1	0,26	3,5	85	2,0-4,5	12	6,50 (0,70-7,90)	>65% za 30 min
<b>Amlodipin-besilat</b>	1	-	0,36	1,82	95	30-50	33	97,20 (17,00-263,3)	>60% za 30 min
<b>Ibuprofen</b>	2	2	1,35	4,0	98	2,0-4,0	33	10,73 (0,007-27,6)	>55% za 60 min
<b>Nimesulid</b>	2	-	4,70	-	100	1,8-4,7	np	10,77 (0,13-12,93)	>85% za 60 min****
<b>Karbamazepin</b>	2	2	3,52	4,3	100	18-65	>60	5,86 (0,48-33,66)	>25% za 60 min
<b>Metformin-hidrochlorid</b>	3	3	0,04	0,35	54	2,0-6,0	45	7,20 (2,50-21,90)	>65% za 60 min
<b>Ranitidin-hidrochlorid</b>	3	3	0,002	0,3	57	2,0-3,0	45	12,03 (2,90-15,44)	~100% za 60 min
<b>Atenolol</b>	3	3	0,013	0,2	50	6,0-9,0	18	404, 54 (0,45-462,72)	~100% za 60 min
<b>Ciprofloksacin-hidrochlorid</b>	1/2/3/4	4	0,41	1,28	69	4,0-7,0	np	19,0 (0,12-125,00)	>85% za 30 min

\*Bocci i sar. (2022); \*\* vrednosti preuzete iz Dahlgren i sar. (2015) ili relevantnih FIP Biowaiver monografija; \*\*\* vrednosti preuzete iz Lennernaäs i sar (2007) i Larregieu i Benet (2014) ili relevantnih FIP Biowaiver monografija)\*\*\*\* vrednosti navedene u zagradi predstavljaju opseg izračunatih vrednosti TS za različite kombinacije ispitivanih in vitro i in vivo profila (videti poglavlje 3); \*\*\*\*\* podatak je preuzet iz Grbić, 2011; np – u medijumu bFaSSIF nije bilo moguće postići rastvaranje 80% supstance;

Dozni broj ispitivanih model supstanci u medijumu koji simulira uslove u tankom crevu (bFaSSIF, FaSSIF ili FP pH 6,8) varira u širokom opsegu, od 0,002 do 4,70. U skladu sa tim, za većinu ispitivanih supstanci, osim nimesulida i karbamazepina, je prilikom ispitivanja brzine rastvaranja pod eksperimentalnim uslovima primenjenim u ovom radu bilo moguće postići rastvaranje celokupne doze. Podaci o doznim brojevima u skladu su sa predloženom klasifikacijom ispitivanih model supstanci na nisko i visoko rastvorljive. Dozni broj za ciprofloksacin-hidrohlorid izračunat na osnovu podatka o rastvorljivosti u FaSSIF-u u skladu je sa literaturnim navodima da se *in vivo* ova lekovita supstanca ponaša kao BCS klasa 1. Podaci o efektivnoj permeabilnosti u skladu su sa predloženom klasifikacijom ispitivanih supstanci na nisko i visoko permeabilne, kada se kao referentna posmatra permeabilnost metoprolola koja je u studiji Dahlgren i sar. (2015) bila  $1,3 \cdot 10^{-4}$  cm/s. Podaci o frakciji apsorbovanog leka ispitivanih lekovitih supstanci takođe su, bile u skladu sa podacima o njihovoj permeabilnosti. Poluvreme eliminacije ispitivanih model supstanci varira u širokom opsegu od 1 do 65 h, i najduže je kod amlodipina i karbamazepina. Što se tiče vremena potrebnog da se pri izabranim referentnim eksperimentalnim uslovima (aparatura sa rotirajućom lopaticom, 50 rpm, bFaSSIF) ispitivanja rastvori 80% lekovite supstance ( $D_{80\%}$ ) kod najvećeg broja model supstanci ono je kraće od 60 min. Ovaj parametar nije bilo moguće definisati za nimesulid i ciprofloksacin-hidrohlorid jer njihovi *in vitro* profili pokazuju plato koji je ispod 80% rastvorene lekovite supstance.

Prikazane vrednosti faktora skaliranja vremenske ose brzine rastvaranja lekovite supstance *in vitro* (TS) odnose se na izabrani referentni profil brzine rastvaranja (aparatura sa lopaticom, 50 rpm, bFaSSIF) i hipotetički *in vivo* input apsorpcije za koji je, za datu supstancu postignuta najbolja IVIVK, što je u slučaju acetilsalicilne kiseline, nimesulida, metformin-hidrohlorida, ranitidin-hidrohlorida, i ciprofloksacin-hidrohlorida profil dobijen GI simulacijom u GastroPlus<sup>TM</sup>-u, u slučaju paracetamola, amlodipin-besilata, ibuprofena, karbamazepina i atenolola profil dobijen GI simulacijom u Simcyp<sup>®</sup>-u. Može se zabeležiti da vrednosti variraju u veoma širokom opsegu od 5,86 do 404,5. Najmanja vrednost TS (5,86) uočena je u slučaju karbamazepina, kod koga je, usled niske rastvorljivosti, brzina rastvaranja *in vitro* bila nešto sporija u odnosu na druge ispitivane supstance. Najviše vrednosti TS zabeležene su kod amlodipin-besilata i atenolola (97,2 i 404,5, redom). Kod atenolola su dobijeni rezultati u saglasnosti sa biofarmaceutskim karakteristikama lekovite supstance s obzirom da se radi o model supstanci BCS klase 3, odnosno visoke rastvorljivosti, ali niske permeabilnosti usled koje atenolol pokazuje sporu i nepotpunu apsorpciju nakon oralne primene. Zanimljivo je da su i kod amlodipin-besilata dobijene veoma visoke vrednosti faktora skaliranja vremenske ose iako se radi o model supstanci koja pripada BCS klasi 1. Dobijeni rezultati mogli bi se objasniti izuzetno velikim volumenom distribucije, gde lekovita supstanca veoma brzo nakon dospevanja u sistemsku cirkulaciju prelazi u periferna tkiva, te je koncentracija amlodipina u plazmi pre svega određena preraspodelom lekovite supstance između perifernih tkiva i sistemske cirkulacije.

Klinički relevantne specifikacije definisane su na osnovu predviđanja razvijenih lek-specifičnih PBPK modela gde su kao ulazni podaci korišćeni *in vitro* profili brzine rastvaranja pri eksperimentalnim uslovima navedenim u ovom radu, izuzev u slučaju nimesulida. Najjuža specifikacija koja odgovara „brzom rastvaranju“ lekovite supstance definisana je za ciprofloksacin-hidrohlorid, što se može objasniti postojanjem apsorpcionog prozora u proksimalnom delu tankog creva. Najšira klinički relevantna specifikacija predložena je za karbamazepin (>25% za 60 min), što je u saglasnosti navodima Kovačević i sar (2008) da je *in vivo* ponašanje karbamazepina pre svega određeno farmakokinetičkim parametrima (dugo poluvreme eliminacije) te u mnogo manjoj meri zavisi od brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata.

# ZAKLJUČAK

Savremene metode biofarmaceutske karakterizacije lekova primenjene su na uzorku od deset model supstanci koje pripadaju različitim klasama BCS, odnosno BDDCS sistema klasifikacije. Ispitivani set lekovitih supstanci izbalansiran je u pogledu broja supstanci koje pripadaju različitim klasama u okviru BCS i BDDCS sistema klasifikacije - tri supstance pripadaju klasi 1 (paracetamol, acetilsalicilna kiselina, amlodipin-besilat), tri klasi 2 (ibuprofen, nimesulid, karamazepin), tri klasi 3 (metformin-hidrohlord, ranitidin-hidrohlord, atenolol), i jedna supstnca (ciprofloksacin-hidrohlord) pokazuje granične vrednosti rastvorljivosti i permeabilnosti, usled čega je različiti autori različito klasifikuju. Sprovedena je opsežna analiza dostupnih literaturnih podataka koje se odnose na fizičko-hemijske, biofarmaceutske i farmakokinetičke karakteristike ispitivanih model supstanci.

Literaturni profili koncentracije lekovite supstance u plazmi analizirani su metodama konvencionalne farmakokinetičke analize i izračunati su *in vivo* input profili. Kod većine model supstanci bilo je moguće primeniti neku od metoda konvencionalne farmakokinetičke analize, izuzev kod nimesulida i karbamazepina koji pokazuju višeprostrornu farmakokinetiku, a zbog niske rastvorljivosti u literaturi nisu dostupni profili koncentracije lekovite supstance u plazmi nakon intravenske ili oralne primene rastvora koji bi bili potrebni za izračunavanje profila *in vivo* apsorpcije/rastvaranja metodom numeričke dekonvolucije. Dobijeni rezultati ukazuju da se u slučaju paracetamola, acetilsalicilne kiseline, ciprofloksacina i ibuprofena apsorpcija odvija brzo, u prvih nekoliko sati nakon primene leka. Apсорpcija metformina, ranitidina i atenolola odvija se sporo, što je u saglasnosti sa njihovom niskom permeabilnošću. Kod amlodipina nije bilo moguće adekvatno predvideti kinetiku apsorpcije na osnovu profila koncentracije lekovite supstance u plazmi, s obzirom da je ona kod amlodipina pre svega određena preraspodelom lekovite supstance između centralne cirkulacije i perifernih tkiva.

Ispitivan je uticaj različitih eksperimentalnih uslova ispitivanja (izbor aparature i medijuma) na brzinu rastvaranja izabranih model supstanci iz tableta. Ispitivanje brzine rastvaranja u aparaturi sa lopaticom je pokazalo da dodatak fizioloških surfaktanata uglavnom ne ispoljava značajan uticaj na brzinu rastvaranja model supstanci iz ispitivanih preparata i slični profili uočeni su i u odgovarajućem medijumu bez surfaktanata. Uporednom analizom rezultata dobijenih za različite model lekovite supstance uočeno je da je kod većine ispitivanih supstanci (osim karbamazepina, nimesulida i ciprofloksacin-hidrohlorida) gotovo kompletno rastvaranje ispitivanih model supstanci iz tableta postignuto u aparaturi sa lopaticom pri brzini od 50 rpm, uz primenu bFaSSIF (pH 6,5) kao medijuma. S obzirom na prednosti koje medijumi bez dodatka surfaktanata imaju u pogledu jednostavnosti pripreme, poboljšane stabilnosti i cene, kao referentni medijum izdvojen je bFaSSIF.

Ispitivanje brzine rastvaranja preparata sa trenutnim oslobađanjem u dinamičkim uređajima za ispitivanje brzine rastvaranja poput aparature sa protočnom ćelijom, aparature sa cilindrom sa povratnim kretanjem i aparature sa staklenim kuglicama nije pokazalo prednost ovih uređaja u razvoju bioprediktivne i diskriminativne metode za ispitivanje brzine rastvaranja ispitivanih preparata sa trenutnim oslobađanjem. Uprkos činjenici da su ovi uređaji razvijeni sa ciljem da obezbede neprestano izlaganje svežem medijumu odnosno *sink* uslove, izmenu medijuma različitog sastava i pH vrednosti, kao i hidrodinamičke uslove koji bliže odgovaraju fiziološkim, rezultati koji su dobijeni u ovom istraživanju nisu potvrdili njihov bioprediktivni potencijal. Ipak, navedeni dinamički uređaji za ispitivanje brzine rastvaranja, pokazali su prednost u odnosu na konvencionalnu aparaturu sa lopaticom kada je u pitanju razvoj bioprediktivne i diskriminativne metode za ispitivanje brzine rastvaranja ibuprofena iz ispitivanih preparata sa produženim oslobađanjem.

Rezultati *in silico* ispitivanja su pokazali da oba ispitivana komercijalno dostupna programska paketa (Simcyp<sup>®</sup> i GastroPlus<sup>™</sup>), na osnovu odgovarajućeg seta ulaznih podataka (fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine lekovite supstance; *in vitro* profili brzine

rastvaranja lekovite supstance iz tableta, faktori koji karakterišu fiziologiju GIT-a), mogu uspešno predvideti apsorpciju ispitivanih model supstanci nakon oralne primene. Ipak, u najvećem broju slučajeva koji su obuhvaćeni ovim radom bilo je neophodno primeniti optimizaciju parametara kako bi se postiglo slaganje simuliranog i *in vivo* profila koncentracije lekovite supstance u plazmi (tzv. „*middle out*“ pristup). Analiza osetljivosti parametara pokazala se vrlo korisnom alatkom koja može ukazati na kritične parametre koji značajno utiču na obim i brzinu apsorpcije. Na primeru model supstance ibuprofena dokazana je i generalizaciona sposobnost razvijenog modela za predviđanje apsorpcije lekovite supstance iz različitih farmaceutskih oblika.

Iako su prisutne izvesne razlike, pre svega u pogledu obima apsorpcije, profili dobijeni Simcyp® i GastroPlus™ simulacijama su, generalno, bili međusobno slični. Pokazano je da se gastrointestinalna simulacija može koristiti kao metoda izbora za predviđanje apsorpcije/*in vivo* brzine rastvaranja lekovitih supstanci kao i za mehanističko proučavanje procesa apsorpcije u slučajevima kada primena konvencionalnih farmakokinetičkih metoda nije moguća (lekovite supstance klase BCS 2 i 4 koje se zbog niske rastvorljivosti ne mogu primeniti u obliku rastvora za intravensku primenu i/ili u slučajevima kada lekovita supstanca pokazuje nelinearnu kinetiku usled izraženog presistemskog metabolizma, uticaja transportera i td.). Rezultati dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije bili su, generalno, u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom konvencionalne farmakokinetičke analize.

Fiziološki zasnovano biofarmaceutsko modelovanje, gde su *in vitro* profili brzine rastvaranja korišćeni kao ulazni parametri za simulacije omogućilo je definisanje klinički značajnih specifikacija za izabrane model supstance. Sprovedene simulacije ukazuju da su postojeće regulatorne preporuke koje zahtevaju veoma brzo rastvaranje lekovite supstance iz preparata (>85% aktivne supstance za 15 min), odnosno brzo rastvaranje (>85% aktivne supstance za 30 min) isuviše stroge i ograničavajuće. Može se zaključiti da bi bilo opravdano postaviti šire specifikacije za podnošenje zahteva za izostavljanje ispitivanja bioekvivalnetnosti *in vivo*. Iako dobijeni rezultati ukazuju da bi se za pojedine klase BCS mogle definisati opšte klinički značajne specifikacije, generalni zaključak je da je poželjno primenjivati pristup „od slučaja do slučaja“. Naime, *in silico* simulacije su pokazale da pored permeabilnosti i rastvorljivosti potrebno je razmotriti i neki druge parametre lekovite supstance, kao što su poluvreme eliminacije i postojanje prozora za apsorpciju u određenom delu GIT-a, prilikom definisanja klinički značajnih specifikacija za *in vitro* brzinu rastvaranja. Utvrđeno je da se pouzdanija predviđanja apsorpcije dobijaju na osnovu *in vitro* profila kod kojih je u slučaju acetilsalicilne kiseline, amlodipin-besilata i ciprofloksacin-hidrohlorida nakon 30 minuta ispitivanja rastvoreno minimum 65, 60 i 85%, redom. U slučaju paracetamola pokazano je da se pouzdanija predviđanja apsorpcije dobijaju na osnovu *in vitro* profila kod kojih je više od 85% lekovite supstance rastvoreno nakon 45 min. Simulacije su pokazale da je u slučaju atenolola i ranitidin-hidrohlorida neophodno potpuno rastvaranje lekovite supstance nakon 60 min ispitivanja, dok se za ibuprofen, nimesulid, karbamazepin i metformin-hidrohlrid, zadovaljavajuća predviđanja apsorpcije lekovite supstance postižu za *in vitro* profile kod kojih je nakon 60 min ispitivanja rastvoreno 55, 85, 25, odnosno 65%, redom.

Iako se generalno smatra da u slučaju preparata sa trenutnim oslobađanjem, naročito kada se radi o lekovitim supstancama koje pokazuju visoku rastvorljivost, nije moguće postići visok stepen *in vitro-in vivo* korelacije, dobijeni rezultati pokazuju da je u većini slučajeva, uz primenu odgovarajuće vrednosti faktora skaliranja vremenske ose *in vitro* podataka, bilo moguće uspostaviti IVIVK nivoa A. Izračunate vrednosti faktora skaliranja vremenske ose *in vitro* podataka variraju u veoma širokom opsegu. Generalno, najniže vrednosti zabeležene su kod nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, kod kojih je usled niske rastvorljivosti, brzina rastvaranja *in vitro* bila nešto sporija u odnosu na druge ispitivane supstance. Rezultati dobijeni primenom

dekonvolucionog i konvolucionog pristupa uspostavljanju IVIVK pokazuju izvesne razlike, međutim uporedna analiza dobijenih podataka omogućava bolje razumevanje odnosa između procesa rastvaranja datih supstanci *in vitro* i *in vivo* čime je olakšan izbor *in vitro* uslova koji mogu da ukažu na ponašanje leka *in vivo*. Može se uočiti da je upravo u slučaju korišćenja rezultata ispitivanja dobijenih u aparaturi sa rotirajućom lopaticom pri brzini od 50 rpm, uz primenu medijuma bFaSSIF (fiziološki zasnovan veštački crevni sok na gladno, bez surfaktanata) kod najvećeg broja model supstanci postignut nivo A IVIVK, te bi se navedeni eksperimentalni uslovi mogli predložiti kao bioprediktivni za najveći broj ispitivanih model supstanci iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.

Rezultati sprovedenih istraživanja doprinose mehanističkom shvatanju procesa rastvaranja/oslobađanja i apsorpcije lekovite supstance i izgradnji integrisanog biofarmaceutskog pristupa u razvoju i karakterizaciji čvrstih farmaceutskih oblika za peroralnu primenu.

# PRILOG 1

Podaci o komercijalnim uzorcima tableta korišćenim u *in vitro* ispitivanjima

Lekovita supstanca	Oznaka	Doza	Vrsta tableta	Sastav	
<b>Paracetamol</b>	P	500 mg	Film tableta	<u>Jezgro</u> Kukuruzni skrob, Pregelirani skrob, Povidon K 25, Kalijum-sorbat, Prečišćeni talk, Stearinska kiselina, Prečišćena voda	<u>Film omotač</u> Hipromeloza, Triacetin
<b>Acetilsalicilna kiselina</b>	AK	500 mg	Neobložena tableta	Celuloza u prahu, Kukuruzni skrob	
<b>Amlodipin-besilat</b>	AB	10 mg	Neobložena tableta	Mikrokristalna celuloza, Kalcijum-hidrogenfosfat, bezvodni, Natrijum-skrobglikolat, Magnezijum-stearat	
<b>Ibuprofen</b>	I1	400 mg	Film tableta	<u>Jezgro:</u> Mikrokristalna celuloza, Kroskarmeloza-natrijum, Laktoza, monohidrat, Silicijum-dioksid, koloidni, bezvodni, Natrijum-laurilsulfat, Magnezijum-stearat	<u>Film omotač:</u> Hipromeloza, Titan-dioksid, Talk
	I2	800 mg	Tableta sa produženim oslobađanjem	<u>Jezgro:</u> Ksantan guma, Stearinska kiselina, Silicijum dioksid, koloidni, bezvodni, Povidon	<u>Film omotač:</u> Talk, Hipromeloza, Titan-dioksid
	I3	800 mg	Tableta sa produženim oslobađanjem	Stearinska kiselina, Silicijum dioksid, koloidni, bezvodni, Magnezijum-stearat, Povidon	



<b>Nimesulid</b>	N	100 mg	Neobložena tableta	Laktoza, monohidrat, Kukuruzni škrob, Kroskarmeloza-natrijum, Silicijum-dioksid, koloidni, bezvodni, Povidon K 30, Natrijum-dokusat, Magnezijum-stearat, Polisorbat 80	
<b>Karbamazepin</b>	K	200 mg	Neobložena tableta	Silicijum-dioksid, koloidni, bezvodni, Mikrokristalna celuloza, Natrijum-skrobglikolat (tip A), Magnezijum-stearat	
<b>Metformin-hidrohlorid</b>	M1	850 mg	Film tableta	<u>Jezgro:</u> Povidon K 30, Magnezijum-stearat	<u>Film omotač:</u> Hipromeloza
	M2	850 mg	Film tableta	<u>Jezgro:</u> Povidon, Propilenglikol, Mikrokristalna celuloza, Kroskarmeloza-natrijum, Magnezijum-stearat	<u>Film omotač:</u> Hipromeloza, Talk, Titan-dioksid, Makrogol 6000
<b>Ranitidin-hidrohlorid</b>	R1	150 mg	Film tableta	<u>Jezgro:</u> Mikrokristalna celuloza, Magnezijum-stearat	<u>Film omotač:</u> Titan-dioksid (E171), Triacetin Metilhidroksipropilceluloza (E464)
	R2	150 mg	Film tableta	<u>Jezgro:</u> Mikrokristalna celuloza, Kopovidon VA-64, Silicijum-dioksid, koloidni, Magnezijum-stearat	<u>Film omotač:</u> Hipromeloza, Makrogol 6000, Titan-dioksid, Metakrilna kiselina, kopolimer
<b>Atenolol</b>	A	100 mg	Film tableta	<u>Jezgro:</u> Kukuruzni škrob, Magnezijum-karbonat, teški, Povidon K 30, Natrijum-skrobglikolat, Magnezijum-stearat	<u>Film omotač:</u> Opadry OY-3455

<b>Ciprofloksacin- hidrochlorid</b>	C1	500 mg	Film tableta	<u>Jezgro:</u> Mikrokristalna celuloza, Kukuruzni skrob, Krospovidon, Silicijum-dioksid, bezvodni, Magnezijum-stearat	<u>Film omotač:</u> Hipromeloza, Makrogol 4000, Titan-dioksid
	C2	500 mg	Film tableta	<u>Jezgro:</u> Natrijum-skrobglikolat, Mikrokristalna celuloza, Kroskarmeloza-natrijum, Magnezijum-stearat, Povidon K 25, Silicijum-dioksid, koloidni, bezvodni	<u>Film omotač:</u> Hipromeloza, Titan-dioksid, Talk, Propilenglikol

# LITERATURA

Abend A, Heimbach T, Cohen M, Kesisoglou F, Pepin X, Suarez S. 2018. Dissolution and Translational Modeling Strategies Enabling Patient-Centric Drug Product Development: M-CERSI Workshop Summary Report. AAPS J. 20: 60.

Abrahamsson B, Ungell AL. 2009. Biopharmaceutical support in formulation development. In: Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide From Candidate Selection to Commercial Dosage Form (ed. M. Gibson). CRC Press. 247-289.

ACD/Labs Software™. Advanced Chemistry Development Inc., [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com).

Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije. 2022. Baza podataka o humanim lekovima (dostupno na <https://www.alims.gov.rs/humani-lekovi/pretrazivanje-humanih-lekova/>).

Ahmad A, Pepin X, Aarons L, Wang Y, Darwich AS, Wood JM, Tannergren C, Karlsson E, Patterson C, Thörn H, et al. 2020. IMI--Oral biopharmaceutics tools project--Evaluation of bottom-up PBPK prediction success part 4: Prediction accuracy and software comparisons with improved data and modelling strategies. Eur. J. Pharm. Biopharm.

Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res. 12, 413-420.

Andreas CJ, Rosenberger J, Butler J, Augustijns P, McAllister M, Abrahamsson B, Dressman J. 2018. Introduction to the OrBiTo decision tree to select the most appropriate in vitro methodology for release testing of solid oral dosage forms during development. Eur J Pharm Biopharm. 130: 207-213.

Artursson P, Karlsson J. 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Biochem Biophys Res Commun 175(3):880–885.

Avdeef A, Fuguet E, Llinas A, Ráfols C, Bosch E, Völgyi G, Verbić T, Boldyreva E, Takacs-Novak K. 2016. Equilibrium solubility measurement of ionizable drugs – Consensus recommendations for improving data quality. ADMET & DMPK 4: 117–178.

Bailey DN, Briggs JR. 2004. The binding of acetaminophen, lidocaine and valproic acid to human milk. Am J Clin Pathol 121: 754–757.

Balimane PV, Han YH, Chong S. 2006. Current Industrial Practices of Assessing Permeability and P-Glycoprotein Interaction. AAPS J. 8: article 1.

Bard B, Martel S, Carrupt PA. 2008. High throughput UV method for estimation of thermodynamic solubility and the determination of the solubility in biorelevant media. Eur J Pharm Sci. 33: 230-240.

Bauer LA. 2008. Applied clinical pharmacokinetics. 2<sup>nd</sup> ed. The McGraw-Hill Companies, Inc.

Bellmann S, Lelieveld J, Gorissen T, Minekus M, Havenaar R. 2016. Development of an advanced in vitro model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology, Food Res. Int. 88:191–198.

Beresford AP, McGibney D, Humphrey MJ, Macrae PV, Stopher DA. 1988. Metabolism and kinetics of amlodipine in man. Xenobiotica. 18(2): 245–254.

Bergan T, Thorsteinsson SB, Kolstad IM, Johnsen S. 1986. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after intravenous and increasing oral doses. Eur J Clin Microbiol. 5: 187–192.

Bergan T. 1990. Extravascular penetration of ciprofloxacin. Diagn Microbiol Infect Dis. 13: 103-104.

Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, Gonzalez I, Fernandez C, Sanchez G, Garrigues TM, Merino V. 2004. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. Eur J Pharm Sci. 21: 429-441.

- Bermejo M, Hens B, Dickens J, Mudie D, Paixao P, Tsume Y, Shedden K, Amidon G. 2020. A Mechanistic Physiologically-Based Biopharmaceutics Modeling (PBBM) Approach to Assess the In Vivo Performance of an Orally Administered Drug Product: From IVIVK to IVIVP. *Pharmaceutics*. 12: 74.
- Bernareggi A. 1998. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clin. Pharmacokinet.* 35: 247-74.
- Bertnall HH, Clarke GS. 1998. Metformin hydrochloride. In: Brittain HG, editor. *Analytical profiles of Drug Substances and Excipients*. CA: Academic; p. 25.
- Bhattachar SN, Perkins EJ, Tan JS, Burns LJ. 2011. Effect of gastric pH on the pharmacokinetics of a BCS class II compound in dogs: utilization of an artificial stomach and duodenum dissolution model and GastroPlus, simulations to predict absorption. *J Pharm Sci.* 100 (11): 4756–65.
- Bhise SB, Rajkumar M. 2008. Effect of HPMC on solubility and dissolution of carbamazepine form III in simulated gastrointestinal fluids. *Asian J Pharm.* 2 (1): 38-42.
- Blanquet S, Zeijdner E, Beyssac E, Meunier JP, Denis S, Havenaar R, Alric M. 2004. A Dynamic Artificial Gastrointestinal System for Studying the Behavior of Orally Administered Drug Dosage Forms Under Various Physiological Conditions. *Pharm Res.* 21 (4): 585-591.
- Bocci G, Oprea TI, Benet LZ. 2022. State of the Art and Uses for the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): New Additions, Revisions and Citation References. *AAPS J.* 24: 37.
- Boetker JP, Rantanen J, Rades T, Mullertz A, Ostergaard J, Jensen H. 2011. A new approach to dissolution testing by UV imaging and finite element simulations. *Pharm Res.* 30 (5): 1328-1337.
- Bogataj M, Cof G, Mrhar A, 2010. Peristaltic movement simulating stirring device for dissolution testing, International application published under the PCT, WO 2010/014046 A1, The International Bureau of WIPO.
- Bogataj M, Cof G, Mrhar A, 2015. Development of a Glass-Bead Device for Dissolution Testing. *Dissolution Technol.* 18-24.
- Borchard U. 1998. Pharmacological properties of beta-adrenoceptor blocking drugs. *J Clin Basic Cardiol.* 1: 5-9.
- Borin MT, Ayres JW. 1989. Single dose bioavailability of paracetamol following oral administration. *Int J Pharm.* 54:199–209.
- Breda SA, Jimenez-Kairuz AF, Manzo RH, Olivera ME. 2009. Solubility behavior and Biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *Int J Pharm.* 371: 106-113.
- British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia*. 2022. London: TSO; 2022.
- Brocks D, Jamali F. 1999. The pharmacokinetics of ibuprofen in humans and animals. In: Rainsford, K.D. (ed) *Ibuprofen: a critical bibliographic review*. London, Taylor & Francis, 89-142.
- Brouwers J, Anneveld B, Goudappel GJ, Duchateau G, Annaert P, Augustijns P, Zeijdner E. 2011. Food-dependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets: In vitro evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system. *Eur J Pharm Biopharm.* 77: 313-319.
- Brouwers J, Augustijns P. 2014. Resolving intraluminal drug and formulation behavior: gastrointestinal concentration profiling in humans. *Eur J Pharm. Sci.* 61: 2-10.
- Butler JM, Dressman JB. 2010. The Developability Classification System: Application of Biopharmaceutics Concepts to Formulation Development. *J Pharm Sci.* 99 (12): 4940-4954.
- Butler J, Hens B, Vertzoni M, Brouwers J, Berben P, Dressman J, Andreas CJ, Schaefer KJ, Mann J, McAllister M, Jamei M, Kostewicz E, Kesisoglou F, Langguth P, Minekus M, Müllertz A, Schilderink R, Koziol M, Jedamzik P, Weitscheis W, Reppas C, Augustijns P. 2019. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms: Recent progress from partnership through the IMI OrBiTo collaboration. *Eur J Pharm Biopharm.* 136: 70-83.

- Carey PF, Martin LE, Owen PE. 1981. Determination of ranitidine and its metabolites in human urine by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 225:161–168.
- Carino SR, Sperry DC, Hawley M. 2006. Relative bioavailability estimation of carbamazepine crystal forms using an artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci.* 95 (1): 116-25.
- Carino SR, Sperry DC, Hawley M. 2010. Relative bioavailability of three different solid forms of PNU-141659 as determined with the artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci.* 99 (9): 3923–30.
- Caron G, Ermondi G, Damiano A, Novaroli, Tsinman O, Ruell JA, Avdeef A. 2004. Ionization, lipophilicity, and molecular modeling to investigate permeability and other biological properties of amlodipine. *Bioorg Med Chem* 12 (23): 6107-6118.
- Cavet ME, West M, Simmons NL. 1997. Fluoroquinolone (ciprofloxacin) secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Brit J Pharmacol.* 121: 1567-1578.
- Charalabidis A, Sfouni M, Bergström C, Macheras P. 2019. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *Int. J. Pharm.* 566: 264-281.
- Chen ML, Yu L. 2009. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. *Mol Pharm.* 6 (1): 74-81.
- Chen F, Liu H, Wang B, Yang L, Cai W, Jiao Z, Yang Z, Chen Y, Quan Y, Xiang X, Wang H. 2020. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Understand the Absorption of Risperidon Orodispersible Film. *Front Pharmacol.* 10: 1692.
- Cheng L, Wong H. 2020. Food Effects on Oral Drug Absorption: Application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling as a Predictive Tool. *Pharmaceutics.* 12: 672.
- Chetty M, Johnson TN, Polak S, Salem F, Doki K, Rostami-Hodjegan A. 2018. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 135: 85-91.
- Chiang PC, Liu J, Nagapudi K, Wu R, Dolton M, Salehi N, Amidon G. 2022. Evaluating the IVIVK by combining Tiny-TIM Outputs and Compartmental PK Model to Predict Oral Exposure for Different Formulations of Ibuprofen. *J Pharm Sci.* 111 (7): 2018-2029.
- Chiou WL, Buehler PW. 2002. Comparison of oral absorption and bioavailability of drugs between monkey and human. *Pharm Res.* 19 (6): 868-74.
- Clavijo GA, de Clavijo GA, Weart CW. 1994. Amlodipine: a new calcium antagonist. *Am J Hosp Pharm.* 51 (1): 59-68.
- Clements JA, Prescott LF. 1976. Data point weighting in pharmacokinetic analysis: Intravenous paracetamol in man. *J Pharm Pharmacol.* 28: 707–709.
- Clements JA, Heading RC, Nimmo WS, Prescott LF. 1978. Kinetics of acetaminophen absorption and gastric emptying in man. *Clin Pharmacol Therap.* 24: 420–431.
- Clements JA, Critchley JA, Prescott LF. 1984. The role of sulfate conjugation in the metabolism and disposition of oral and intravenous paracetamol in man. *Br J Clin Pharmacol.* 18: 481–485.
- Collet A, Higgs NB, Sims E, Rowland M, Warhurst G. 1999. Modulation of the permeability of H<sub>2</sub> receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 288: 171–178.
- Conway FJ, Fitzgerald JD, McAinsh J, Rowlands DJ, Simpson WT. 1976. Human pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on atenolol, a new cardioselective  $\beta$ -adrenoceptor blocking drug. *Br J Clin Pharmacol.* 3: 267 – 272.
- Cooke AR, Hunt JN. 1970. Absorption of acetylsalicylic acid from unbuffered and buffered gastric contents. *Am J Dig Dis.* 15 (2): 95–102.

- Craig PN. 1990. Drug compendium. In: Hansch C, Sammes PG, Taylor JB, editors. *Comprehensive medicinal chemistry*. Oxford: Pergamon Press. 237-965.
- Crison JR, Timmins P, Keung A, Upreti VV, Boulton DW, Scheer BJ. 2012. Biowaiver approach for biopharmaceutics classification system class 3 compound metformin hydrochloride using in silico modeling. *J Pharm Sci*. 101: 1773–1782.
- Cutler DJ. 1978. Linear system analysis in pharmacokinetics. *Pharmacokinetic Biopharm*. 6: 265-282.
- Cvijić S, Parojčić J, Langguth P. 2014. Viscosity-mediated negative food effect on oral absorption of poorly-permeable drugs with an absorption window in the proximal intestine: in vitro experimental simulation and computational verification, *Eur J Pharm Sci*. 61: 40–53.
- Cvijić S, Ibrić S, Parojčić J. 2020. Integrated biopharmaceutical approach in pharmaceutical development and drug characterization: general concept and application. *Hem. Ind*. 74 (6): 389-397.
- Dahlgren D, Roos C, Sjögren E, Lennernäs H. 2015. Direct In Vivo Human Intestinal Permeability (Peff ) Determined with Different Clinical Perfusion and Intubation Methods. *J Pharm Sci*. 104 (9): 2702-26.
- Dalton JT, Straughn AB, Dickason DA, Grandolfi GP. 2001. Predictive ability of level A in vitro– in vivo correlation for RingCap controlled-release acetaminophen tablets. *Pharm Res* 18:1729–1734.
- Darwich AS, Margolskee A, Pepin X, Aarons L, Galetin A, Rostami-Hodjegan A, Carlert S, Hammarberg M, Hilgendorf C, Johansson P, Karlsson E, Murphy D, Tannergren C, Thörn H, Yasin M, Mazuir F, Nicolas O, Ramusovic S, Xu C, Pathak SM, Korjamo T, Laru J, Malkki J, Pappinen S, Tuunainen S, Dressman J, Hansmann S, Kostewicz E, He H, Heimbach T, Wu F, Hoft C, Pang Y, Bolger MB, Huehn E, Lukacova V, Mullin JM, Szeto KX, Costales C, Lin J, McAllister M, Modi S, Rotter C, Varma M, Wong M, Mitra A, Bevernage J, Biewenga J, Van Peer A, Lloyd R, Shardlow C, Langguth P, Mishenzon I, Nguyen MA, Brown J, Lennernäs H, Abrahamsson B. 2017. IMI – Oral biopharmaceutics tools project – Evaluation of bottom-up PBPK prediction success part 3: Identifying gaps in system parameters by analysing In Silico performance across different compound classes. *Eur. J. Pharm. Sci*. 96: 626–642.
- Davanco MG, Campos DR, de Oliveira Carvalho P. 2020. In vitro-in vivo correlation in the development of oral drug formulation: A screenshot of the last two decades. *Int J Pharm*. 580: 119210.
- D'Arcy DM. 2007. Use of computational fluid dynamics to investigate the relationship between hydrodynamics and rates of dissolution; Dublin: Trinity College Dublin.
- D'Arcy DM, Liu B, Corrigan OI. 2011. Investigating the effect of solubility and density gradients on local hydrodynamics and drug dissolution in the USP 4 dissolution apparatus. *Int J Pharm*. 419 (1–2): 175–85.
- Davies NM. 1998. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinetic*. 34: 101–154.
- Dellis D, Gianis C, Tsantili-Kakoulidou A. 2007. Physicochemical profile of nimesulide: exploring the interplay of lipophilicity, solubility and ionization. *J Pharm Biomed Anal*. 44: 57-62.
- Dickinson PA, Abu Rmaileh R, Ashworth L, Barker RA, Burke WM, Patterson CM, Stainforth N, Yasin M. 2012. An investigation into the utility of a multicompartmental, dynamic, system of the upper gastrointestinal tract to support formulation development and establish bioequivalence of poorly soluble drugs. *AAPS J*. 14: 196–205.
- Dickinson PA, Kesisoglou F, Flanagan T, Martinez MN, Mistry HB, Crison JR, Polli JE, Cruaños MT, Serajuddin ATM, Müllertz A, Cook JA, Selen A. 2016. Optimizing Clinical Drug Product Performance: Applying Biopharmaceutics Risk Assessment Roadmap (BioRAM) and the BioRAM Scoring Grid. *J Pharm Sci*. 105 (11): 3243-3255.
- Dietzel CT, Richert H, Albert S, Merkel U, Hippins M, Stallmach A. 2012. Magnetic Active Agent Release System (MAARS): Evaluation of a new way for reproducible, externally controlled drug release into the small intestine. *J Control Release*. 161 (3): 722-727.

- Dodd S, Kollipara S, Sanchez-Felix M, Kim H, Meng Q, Beato S, Heimbach T. 2019. Prediction of ARA/PPI Drug-Drug Interactions at the Drug Discovery and Development Interface. *J Pharm Sci* 108 (1): 87-101.
- Dokoumetzidis A, Macheras P. 2008. IVIVK of controlled release formulations: physiological-dynamical reasons for their failure. *J Control Release*. 129(2): 76-78
- Dollery C. 1999. *Therapeutic Drug*, 2<sup>nd</sup> ed.; Churchill: Liverpool.
- Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah V P. 1998. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res*. 15 (1): 11-22.
- Dressman J, Nair A, Abrahamsson B, Barends DM, Groot DW, Kopp S, Langguth P, Polli JE, Shah VP, Zimmer M. 2012. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Acetylsalicylic Acid. *J Pharm Sci*. 101 (8): 2654-2667.
- Drusano GL, Standiford HC, Plaisance K, Forrest A, Leslie J, Caldwell J. 1986. Absolute oral bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 30: 444-446.
- Dunne A. 2007. Approaches to developing *in vitro-in vivo* correlation models. In: Chilukuri DM, Sunkara G, Young D, editors. *Pharmaceutical product development: in vitro-in vivo correlation*. New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- Eandi M, Viano I, Ricci Camalero S. 1984. Absolute bioavailability of paracetamol after oral and rectal administration in healthy volunteers. *Drug Res*. 34: 903-907.
- El Obeid HA, Al-Bard AA. 1985. Acetaminophen. In: Florey K, editor. *Analytical profiles of drugs substances*, Vol 14. London: Academic Press, Inc. pp 551-596.
- Escribano E, Calpena AC, Garrigues TM, Freixas J, Domenech J, Moreno J. 1997. Structure-absorption relationships of a series of 6-fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1996-2000.
- Etman MA, Naggar VF. 1990. Thermodynamics of paracetamol solubility in sugar-water cosolvent systems. *Int J Pharm* 58: 177-184.
- European Medical Agency. 2014. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms (EMA/CPMP/EWP/280/96 CorR1).
- European Medical Agency. 2016. Activity report of the Modelling and simulation working group (MSWG). Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/2016-activity-report>.
- European Medical Agency. 2018. Guideline on the reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation (EMA/CHMP/458101/2016).
- European Medical Agency. 2020. ICH guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers (EMA/CHMP/ICH/493213/2018).
- European Pharmacopoeia commission. 2019. *European pharmacopoeia* 10<sup>th</sup> ed. Strasbourg. Council of Europe.
- Fagerberg JH, Bergström CA. 2015. Intestinal solubility and absorption of poorly water soluble compounds: predictions, challenges and solutions. *Ther Deliv*. 6 (8): 935-959.
- Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. 1996. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm Res*. 13: 1336-1342.
- Farmakoterapijski vodič 7. 2022. Beograd: Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije.
- Faulkner JK, McGibney D, Chasseand LF, Perry JL, Taylor IW. 1986. The pharmacokinetics of amlodipine in healthy volunteers after single intravenous and oral doses given once daily. *Br J Clin Pharmacol*. 22: 21-25.
- FIP. Biowaiver monographs. [Online]. Dostupno na: [https://www.fip.org/bcs\\_monographs](https://www.fip.org/bcs_monographs) [poslednji pristup 13.08.2022. godine].

- Fitzgerald JD, Ruffin R, Smedstad KG, Roberts F, McAinsh J. 1978. Studies on pharmacokinetics and pharmacodynamics of atenolol in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 13: 81-89.
- Fitzgerald JD. 1979. Pharmacological and biochemical properties of drug substances. In: Goldberg ME, editor. *Atenolol*, Vol. 2. American Pharmaceutical Association, Academy of Pharmaceutical Science, Washington, USA: Raven Press, USA. 98–147.
- Fitzgerald JD. 1980. Pharmacology of antihypertensive drugs. In: Scriabine A, editor. *Atenolol*. American Pharmaceutical Association, Academy of Pharmaceutical Science, Washington, USA: Raven Press, USA. 263–273.
- Food and Drug Administration. 1995. Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, *In Vitro* Dissolution Testing, and *In Vivo* Bioequivalence Documentation.
- Food and Drug Administration 1997. Guidance for Industry: Extended-Release Oral dosage Forms: Development, Evaluation and Application of *In Vitro/In Vivo* Correlation.
- Food and Drug Administration. 2017. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, Rev 1.eDraft Guidance. Silver Spring, MD: FDA.
- Food and Drug Administration. 2018. Guidance for Industry Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses — Format and Content.
- Food and Drug Administration. 2020. The Use of Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses — Biopharmaceutics Applications for Oral Drug Product Development, Manufacturing Changes, and Controls Guidance for Industry.
- Forrest JA, Clements JA, Prescott LF. 1982. Clinical pharmacokinetics of paracetamol (abstract). *Clin Pharmacokinet*. 7: 93–107.
- Fotaki N, Symillides M, Reppas C. 2005. In vitro versus canine data for predicting input profiles of isosorbide-5-monohydrate from oral extended release products on a confidence interval basis. *Eur. J. Pharm. Sci*. 24: 115-122.
- Frechen S, Rostami-Hodjegan A. 2022. Quality Assurance of PBPK Modeling Platforms and Guidance on Building, Evaluating, Verifying and Applying PBPK Models Prudently under the Umbrella of Qualification: Why, When, What, How and by Whom? *Pharm. Res*. 39 (8): 1733-1748.
- Freidman H, Seckman C, Lanza F, Perry K, Francom S. 1990. Clinical pharmacology of predisintegrated ibuprofen 800mg tablets: an endoscopic and pharmacokinetic study. *J Clin Pharmacol*. 30: 57-63.
- Gabard B, Nirnberger G, Schiel H, Mascher H, Kikuta C, Mayer JM. 1995. Comparison of the bioavailability of dexibuprofen administered alone or as part of racemic ibuprofen. *Eur J Clin Pharmacol*. 48: 505–511.
- Gabriels M, Plaizier-Vercammen J. 2004. Design of a dissolution system for the evaluation of the release rate characteristics of artemether and dihydroartemisinin from tablets. *Int J Pharm*. 274 (1–2): 245–60.
- Galia E, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB. 1998. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting In Vivo Performance of Class I and II Drugs. *Pharm. Res*. 5 (5): 698-705.
- Gao Z. 2009. In Vitro Dissolution Testing with Flow-Through Method: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*. 10 (4): 1401.
- Garekani HA, Sadeghi F, Ghazi A. 2003. Increasing the aqueous solubility of acetaminophen in the presence of polyvinylpyrrolidone and investigation of the mechanisms involved. *Drug Dev Ind Pharm* 29: 173–179.
- García MA, Bolger MB, Suarez-Sharp S, Langguth P. 2021a. Predicting Pharmacokinetics of Multisource Acyclovir Oral Products Through Physiologically Based Biopharmaceutics Modelling. *J Pharm Sci*. 111: 262-273.



- García MA, Cristofolletti R, Abrahamsson B, Groot DW, Parr A, Polli JE, Mehta M, Shah VP, Tomakazu T, Dressman JB, Langguth P. 2021b. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Carbamazepine. *J Pharm Sci.* 110 (5):1935-1947.
- Garg DC, Weidler DJ, Baltodano N, Eshelman FN. 1981. Pharmacokinetics of ranitidine, a new histamine H<sub>2</sub>-receptor blocker. *Br J Clin Pharmacol* 29: 247–248.
- GastroPlus™ User Manual version 8.0. 2014. Simulations Plus Inc. Lancaster, CA, USA.
- Gaynar C, Dunne A, Davis J. 2008. A comparison of the prediction accuracy of the two IVIVC modelling techniques. *J Pharm Sc.* 97 (8): 3422-32.
- Geisslinger G, Dierzel K, Bezler H, Nuernberg B, Brune K. 1989. Therapeutically relevant differences in the pharmacokinetic and pharmaceutical behaviour of ibuprofen lysinate as compared to ibuprofen acid. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 27: 324-328.
- Geisslinger G, Schuster O, Stock KP, Loew D, Bach GL, Brune K. 1990. Pharmacokinetics of S(+)- and R(-)-ibuprofen in volunteers and first clinical experience of S(+)-ibuprofen in rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol.* 38: 493–497.
- Geisslinger G, Stock KP, Loew D, Bach GL, Brune K. 1993. Variability in the stereoselective disposition of ibuprofen in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 35: 603-607.
- George CF. 1981. Drug metabolism by the gastrointestinal mucosa. *Clin Pharmacokinet* 6 (4): 259–274.
- Gérardin AP, Abadie FV, Campestrini JA, Theobald W. 1976. Pharmacokinetics of carbamazepine in normal humans after single and repeated oral doses. *J Pharmacokinet Biopharm.* 4 (6): 521-35.
- Gerhart JG, Carreno FO, Edginton AN, Sinha J, Perrin EM, Kumar KR, Rikhi A, Hornik CP, Harris V, Ganguly S, Cohen-Wolkowicz M, Daniel G. 2021. Development and Evaluation of a Virtual Population of Children with Obesity for Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *Clin Pharmacokinet.* 61: 307-320.
- Ghahramani P, Rowland-Yeo K, Yeo WW, Jackson PR, Ramsay LE. 1998. Protein binding of aspirin and salicylate measured by in vivo ultrafiltration. *Clin Pharmacol Ther.* 63 (3): 285-95.
- Ghoshal UC, Sengar V, Srivastava D. 2012. Colonic transit time study technique and interpretation: Can these be uniform globally in different populations with non-uniform colon transit time. [Letter to the editor]. *J Neurogastroenterol Motil.* 18: 227-228.
- González-García I, Mangas-Sanjuán V, Merino-Sanjuán M, Bermejo M. 2015. *In vitro-in vivo* correlations: general concepts, methodologies and regulatory applications. *Drug Dev Ind Pharm.* 1-13.
- Grady H, Elder D, Webster GK, May Y, Lin Y, Hanagan T, Mann J, Blanchard A, Cohen MJ, Lin J, Kesisoglou F, Hermans A, Abend A, Zhang L, Curran D. 2018. Industry's View on Using Quality Control Biorelevant, and Clinically Relevant Dissolution Tests for Pharmaceutical Development, Registration, and Commercialization. 107: 34-41.
- Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Dooge MP, Doung JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenap LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 50 (2): 81-98.
- Gramatté T, Richter K. 1994. Paracetamol absorption from different sites in the human small intestine. *Br J Clin Pharmacol* 37: 608-611.
- Grattan T, Hickman R, Darby-Dowman A, Hayward M, Boyce M, Warrington S. 2000. A five way crossover human volunteer study to compare the pharmacokinetics of paracetamol following oral administration of two commercially available paracetamol tablets and three development tablets containing paracetamol in combination with sodium bicarbonate or calcium carbonate. *Eur J Pharm Biopharm.* 49: 225–229.

- Gray VA. 2018. Power of the Dissolution Test in Distinguishing a Change in Dosage Form Critical Quality Attributes. *AAPS PharmSciTech*. 19: 3328–3332.
- Grbić S. 2011. Razvoj biorelevantnog medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. Doktorska disertacija. Beograd.
- Grbić S, Parojcic J, Djuric Z. 2013. Computer-aided biopharmaceutical characterization: gastrointestinal absorption simulation. *Computer-aided applications in pharmaceutical technology*. Woodhead Publishing Limited; p 177-232
- Grimstein M, Yang Y, Zhang X, Grillo J, Huang SM, Zineh I, et al. 2019. Physiologically based pharmacokinetic modeling in regulatory science: An update from the U.S. Food and Drug Administration's Office of Clinical Pharmacology. *J Pharm Sci*. 108 (1): 21-5.
- Grundy JS, Anderson KE, Rogers JA, Foster RT. 1997. Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. II. Improved *in vitro-in vivo* correlation using a two-phase dissolution test. *J Control Release*. 48 (1): 9–17.
- Gu CH, Rao D, Gandhi RB, Hilden J, Raghavan K. 2005. Using a novel multicompartiment dissolution system to predict the effect of gastric pH on the oral absorption of weak bases with poor intrinsic solubility. *J Pharm Sci*. 94 (1): 199–208.
- Gura KM. 2012. Drug Dosing and Pharmacokinetics. In: Duggan CP, Gura KM, Jaksic T. *Clinical Management of Intestinal Failure*. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida.
- Hansmann S, Miyaji Y, Dressman J. 2018. An *in silico* approach to determine challenges in the bioavailability of ciprofloxacin, a poorly soluble weak base with borderline solubility and permeability characteristics. *Eur J Pharm Biopharm*. 122: 186-196.
- Harder S, Fuhr U, Beermann D, Staib AH. 1990. Ciprofloxacin absorption in different regions of the human gastrointestinal tract. Investigations with hf-capsule. *Brit J Clin Pharmacol*. 30: 35–39.
- Hartmanshenn C, Scherholz M, Androulakis IP. 2016. Physiologically-based pharmacokinetic models: approaches for enabling personalized medicine. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 43 (5): 481-504.
- Harwood MD, Neuhoff S, Carlson GL, Warhurst G, Rostami-Hodjegan A. 2012. Absolute abundance and function of intestinal drug transporters: a prerequisite for potpuniy mechanistic *in vitro - in vivo* extrapolation of oral drug absorption. *Biopharm Drug Dispos*. 34: 2–28.
- Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS. 1979. Atenolol: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in angina pectoris and hypertension. *Drugs*. 17: 425–460.
- Heigoldt U, Sommer F, Daniels R, Wagner K-G. 2010. Predicting *in vivo* absorption behavior of oral modified release dosage forms containing pH-dependent poorly soluble drugs using a novel pH adjusted biphasic *in vitro* dissolution test. *Eur J Pharm Biopharm*. 76 (1): 105–11.
- Heikkilä T, Karjalainen M, Ojala K, Partola K, Lammert F, Augustijns P, Urtti A, Yliperttula M, Peltonen L, Hirvonen J. 2011. Equilibrium drug solubility measurements in 96-well plates reveal similar drug solubilities in phosphate buffer pH 6.8 and human intestinal fluid. *Int J Pharm*. 405 (1-2): 132-136.
- Heimbach T, Suarez-Sharp S, Kakhi M, Holmstock N, Olivares-Morales A, Pepin X, Sjögren E, Tsakalozou E, Seo P, Li M, Zhang X, Lin HP, Montague T, Mitra A, Morris D, Patel N, Kesisoglou F. 2019. Dissolution and Translational Modeling Strategies Toward Establishing an *In Vitro-In Vivo* Link-a Workshop Summary Report. *AAPS J*. 2019. 21 (2): 29.
- Heimbach T, Chen Y, Chen J, Dixit V, Parrot N, Peters SA, Poggesi I, Sharma P, Snoeys J, Shebley M, Tai G, Tse S, Upreti VV, Wang YH, Tsai A, Xia B, Zheng M, Zhu AZX, Hall S. 2020. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Renal and Hepatic Impairment Populations: A Pharmaceutical Industry Perspective. *Clin. Pharm. Therap*. 110 (2): 297-310.

- Hermans A, Abend AM, Kesisoglou F, Flanagan T, Cohen MJ, Diaz DA, Mao Y, Yhang L, Webster GK, Lin Y, Hahn DA, Coutant CA, Grady H. 2017. Approaches for Establishing Clinically Relevant Dissolution Specifications for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. *AAPS J.* 19: 1537–1549.
- Higgins JD, Gilmore TP, Martellucci SA, Bruce RD. 2001. In Brittain H.G., editor. *Analytical profiles of drug substances and excipients*, vol. 27: San Diego, London, Academic Press. 265-330.
- Hoffken G, Lode H, Prinzing C, Borner K, Koeppe P. 1985. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and parenteral administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 27: 375–379.
- Homšek I, Parojčić J, Dačević M, Petrović Lj, Jovanović D. 2010. Justification of metformin hydrochloride biowaiver criteria based on bioequivalence study. *Drug Res.* 60 (9): 553-559.
- Hutt AJ, Caldwell J, Smith RL. 1982. The metabolism of [carboxyl-14C]aspirin in man. *Xenobiotica* 12 (10): 601–610.
- Jack DB. 1992. *Handbook of clinical pharmacokinetic data*. Macmillan, Basingstoke.
- Jacob S, Nair AB. 2018. An updated overview with simple and practical approach for developing in vitro-in vivo correlation. *Drug Dev Res.* 79 (3): 97-100.
- Jamali F, Mehvar R, Russell AS, Sattari S, Yakimets WW, Koo J. 1992. Human pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers following different doses and formulations: intestinal chiral inversion. *J Pharm Sci.* 81: 221-225.
- Jamei M, Turner D, Yang J, Neuhoff S, Polak S, Rostami-Hodjegan A, Tucker G. 2009. Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption. *AAPS J.* 11 (2): 225-237.
- Jamei M, Abrahamsson B, Brown J, Bevernage J, Bolger MB, Heimbach T, Karlsson E, Kotzagiorgis E, Lindahl A, McAllister M, Mullin JM, Pepin X, Tistaert C, Turner DB, Kesisoglou F. 2020. Current status and future opportunities for incorporation of dissolution data in PBPK modeling for pharmaceutical development and regulatory applications: OrBiTo consortium commentary. *Eur J Pharm Biopharm.* 155: 55-68.
- Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. 2008. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res.* 25 (7): 1663-1676.
- Jereb R, Opara J, Legen I, Petek B, Bajc A, Žakelj S, et al. 2019. PBPK absorption modeling of food effect and bioequivalence in fed state for two formulations with crystalline and amorphous forms of BCS 2 class drug in generic drug development. *AAPS PharmSciTech.* 20 (2): 1-10.
- Ji B, Liu S, Xue Y, He X, Man VH, Xie XQ, Wang J. 2019. Prediction of Drug-Drug Interactions Between Opioids and Overdosed Benzodiazepines Using Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulation. *Drugs RD.* 19 (3): 297-305.
- Jones H, Rowland-Yeo K. 2013. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. 2 (8): e63.
- Jovanović D, Kilibarda V, Todorović V, Potrebić O. 2005. A pharmacokinetic comparison of three pharmaceutical formulations of nimesulide in healthy volunteers. *Vojnosanit Pregl.* 62 (12): 887-93.
- Kakhi M, Marroum P, Chittenden J. 2013. Analysis of level A in vitro–in vivo correlations for an extended-release formulation with limited bioavailability. *Biopharm Drug Dispos.* 34(5): 262–277.
- Kalantzi L, Reppas C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Stavchansky SA, Barends DM. 2006. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: acetaminophen (paracetamol). *J Pharm Sci.* 95 (1): 4-14.
- Källström E, Heikinheimo M, Quiding H. 1988. Bioavailability of three commercial preparations of ibuprofen 600 mg. *J Int Med Res.* 16: 44–49.
- Kapp RW. 2004. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 3rd edition Edited by Anthony C. Moffat, M. David Osselton, and Brian Widdop Publisher: Pharmaceutical Press: London.

- Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL. 2004. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 1: 85-96.
- Kataoka M, Masaoka Y, Yamazaki Y, Sakane T, Sezaki H, Yamashita S. 2003. In vitro system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharm. Res.* 20: 1674–1680.
- Kataoka M, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S. 2006. Effect of food intake on the oral absorption of poorly water-soluble drugs: in vitro assessment of drug dissolution and permeation assay system. *J Pharm Sci.* 95 (9): 2051-61.
- Kataoka M, Sugano K, da Costa Mathews C, Wong JW, Jones KL, Masaoka Y, et al. 2012. Application of dissolution/permeation system for evaluation of formulation effect on oral absorption of poorly water-soluble drugs in drug development. *Pharm Res.* 29 (6): 1485–94.
- Kataoka M, Yano K, Hamatsu Y, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S. 2013. Assessment of absorption potential of poorly water-soluble drugs by using the dissolution/permeation system. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Official J. Arbeitsgemein. Pharm. Verfahrenstech.*
- Kendall MJ, Jubb R, Bird HA, le Galez P, Hill J, Taggart AJ, Rau R. 1990. A pharmacokinetic comparison of ibuprofen sustained-release tablets given to young and elderly patients. *J Clin Pharm Ther.* 15: 35-40.
- Kesisoglou F, Xia B, Agrawal NGB, 2015. Comparison of Deconvolution-Based and Absorption Modeling IVIVK for Extended Release Formulations of BCS III Drug Development Candidate. *AAPS J.* 17(6): 1492-1500.
- Kesisoglou F, Vertzoni M, Reppas C. 2018. Physiologically Based Absorption Modeling of Salts of Weak Bases Based on Data in Hypochlorhydric and Achlorhydric Biorelevant Media. *AAPS PharmSciTech* 19: 2851-2858.
- Kesisoglou F. 2020. Can PBPK Modeling Streamline Food Effect Assessments? *J Clin Pharmacol.* 60: S98-S104.
- Kim TH, Shin S, Jeong SW, Lee JB, Shin BS. 2019. Physiologically Relevant In Vitro-In Vivo Correlation (IVIVK) Approach for Sildenafil with Site-Dependent Dissolution. *Pharmaceutics.* 11(6):251.
- Kirch W, Gorg KG. 1982. Clinical pharmacokinetics of atenolol. A review. *Eur J Drug Metab Pharmacokin.* 7: 81–91.
- Klein S, Garbacz G, Pišlar M, Locatelli I, Liu C, Weitschies W, Siegmund W, Mrhar A, Bogataj M. 2013. The role of individual gastric emptying of pellets in the prediction of diclofenac in vivo dissolution. *J Control Release.* 166 (3): 286-93.
- Kokot Z, Zmidzinska H. 2001. Solubility and dissolution rate of ibuprofen in ionic and non-ionic micellar systems. *Acta Pol Pharm.* 58 (2): 117-120.
- Kortejärvi H, Yliperttula M, Dressman JB, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Barends DM. 2005. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ranitidine hydrochloride. *J Pharm Sci.* 94: 1617–1625.
- Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, Dickinson PA, Dressman J, Holm R, Klein S, Mann J, McAllister M, Minekus M, Muenster U, Müllertz A, Verwei M, Vertzoni M, Weitschies W, Augustijns P. 2014. *In vitro* models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.* 57: 342-366.
- Kovačević I, Parojčić J, Homšek I, Tubić-Grozdanis M, Langguth P. 2008. Justification of Biowaiver for Carbamazepine, a Low Soluble High Permeable Compound. In *Solid Dosage Forms Based on IVIVK and Gastrointestinal Simulation.* *Mol. Pharm.* 6 (1): 40-47.
- Kozjek F, Palka E, Krizman I, Vodopivec P. 1996. Pharmacokinetics of ciprofloxacin metal complexes. *Acta Pharm.* 46: 109-114.

- Kuemmel C, Yang Y, Zhang X, Florian J, Zhu H, Tegenge M, Huang SM, Wang Y, Morrison T, Zineh I. 2020. Consideration of a credibility assessment framework in model-informed drug development: potential application to physiologically-based pharmacokinetic modeling and simulation. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 9: 21–28.
- Ladumor MK, Unadkat JD. 2022. Predicting Regional Respiratory Tissue and Systemic Concentrations of Orally Inhaled Drugs through a Novel PBPK model. *Drug Metab Dispos.* 50 (5): 519-528.
- Lagenbucher F. 1972. Linearization of Dissolution Rate Curves by Weibull Distribution. *J. Pharm. Pharmacol.* 24: 979-981.
- Larregieu C, Benet L. 2014. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. *Mol Pharm.* 11 (4): 1335-44.
- Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS. 2014. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res.* 42 (1): D1091-7.
- Lebert PA, MacLeod SM, Mahon WA, Soldin SJ, Vandenberghe HM. 1981. Ranitidine kinetics and dynamics. I. Oral dose studies. *Clin Pharmacol Ther Oct.* 539–544.
- Lee K, Ng C, Brouwer KLR, Thakker DR. 2002. Secretory transport of ranitidine and famotidine across Caco-2 cell monolayers. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303 (2): 574-580.
- Ledergerber B, Bettex JD, Joos B, Flepp M, Luthy R. 1985. Effect of standard breakfast on drug absorption and multiple-dose pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 27: 350-352.
- Leeman TD, Tanson C, Bonnabry C, Dayer P. 1993. A major role for cytochrome P450 (CYP2C) subfamily in the actions of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs Exp Clin Res.* 19: 189-195.
- Le Merdy M, Fan J, Bolger MB, Lukacova V, Spires J, Tsakalozou E, et al. 2019. Application of mechanistic ocular absorption modeling and simulation to understand the impact of formulation properties on ophthalmic bioavailability in rabbits: a case study using dexamethasone suspension. *AAPS J.* 21 (4): 1-11.
- Le Merdy M, Lukacova V, Tau ML, Babiskin A, Zhao L. 2022. Clinical Ocular Exposure Extrapolation Using PBPK Modeling and Simulation: Moxifloxacin Solution Case Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 63 (7): F0137.
- Lennernas H. 1998. Human intestinal permeability. *J. Pharm. Sci.* 87: 403–410.
- Lennernas H. 2007. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica.* 37 (10-11): 1015-51
- Lennernas H. 2014. Regional intestinal drug permeation: Biopharmaceutics and drug development. *Eur J Pharm Sci.* 57: 333-341.
- Lentz KA, Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Polli JE. 2000. Influence of passive permeability on apparent P-glycoprotein kinetics. *Pharm Res* 17: 1456–1460.
- Lettieri JT, Rogge MC, Kaiser L, Echols RM, Heller AH. 1992. Pharmacokinetic profiles of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 993–996.
- Leuner C, Dressman J. 2000. Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions. *Eur J Pharm Biopharm.* 50: 47-60.
- Levis KA, Lane ME, Corrigan OI. 2003. Effect of buffer media composition on the solubility and effective permeability coefficient of ibuprofen. *Int J Pharm.* 253: 49-59.
- Levy G, Leonards JR, Procknal JA. 1965. Development of *in vitro* dissolution tests which correlate quantitatively with dissolution rate limited drug absorption in man. *J Pharm Sci.* 54 (12): 1719– 22.

- Li M, Zhao P, Pan Y, Wagner C. 2018. Predictive performance of physiologically based pharmacokinetic models for the effect of food on oral drug absorption: current status. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 7: 82–89.
- Li X, Yang Y, Zhang Y, Wu C, Jiang Q, Wang W, Li H, Li J, Luo C, Wu W, Wang Y, Zhang T. 2019. Justification of biowaiver and dissolution rate specifications for piroxicam immediate release products based on physiologically based pharmacokinetic modeling: An in-Depth analysis. *Mol Pharm.* 16 (9): 3780-90.
- Lin W, Chen Y, Unadkat JD, Zhang X, Wu D, Heimbach T. 2022. Applications, Challenges, and Outlook for PBPK Modeling and Simulation: A Regulatory, Industrial and Academic Perspective. *Pharm Res.* 39: 1701-1731.
- Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. 2004. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm.* 58: 265–278.
- Litou C, Vertzoni M, Goumas C, Vasdekis V, Xu W, Kesisoglou F, Reppas C. 2016. Characteristics of the Human Upper Gastrointestinal Contents in the Fasted State Under Hypo- and A-chlorhydric Gastric Conditions Under Conditions of Typical Drug – Drug Interaction Studies. *Pharmaceutical Research* 33 (6): 1399-1412.
- Liu J, Nagapudi K, Dolton J, Chiang PC. 2021. Utilizing Tiny-TIM to Assess the Effect of Acid-Reducing Agents on the Absorption of Orally Administered Drugs. 110 (8): 3020-3026.
- Lockwood GF, Albert KS, Gillespie WR, Bole GG, Harkcom TM, Szpunar GJ, Wagner JG. 1983. Pharmacokinetics of ibuprofen in man. I. Free and total area/dose relationships. *Clin Pharmacol Ther.* 34: 97–103.
- Loo JCK, Riegelman S. 1968. New method for calculating the intrinsic absorption rate of drugs. *J Pharm.Sci.* 57: 918-928.
- Luzon E, Blake K, Cole S, Nordmark A, Versantvoort C, Berglund EG. 2017. Physiologically based pharmacokinetic modeling in regulatory decision-making at the European Medicines Agency. *Clin Pharmacol Ther.* 102 (1): 98-105.
- Macheras P, Karalis V. 2014. A non-binary biopharmaceutical classification of drugs: The AB $\Gamma$  system. *Int J Pharm.* 464 (1-2): 85-90.
- Macheras P, Iliadis A, Melagraki G. 2018. A reaction limited in vivo dissolution model for the study of drug absorption: Towards a new paradigm for the biopharmaceutic classification of drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 117: 98-106.
- MacKichan JJ, Zola EM. 1984. Determinants of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide binding to serum protein, albumin and  $\alpha$ -acidglycoprotein. *Br J Clin Pharmac.* 18: 487-93.
- Madsen CM, Feng KI, Leithead A, Canfield N, Jørgensen SA, Müllertz A, Rades T. 2018. Effect of composition of simulated intestinal media on the solubility of poorly soluble compounds investigated by design of experiments. *Eur J Pharm Sci.* 111: 311–319.
- Mann JC, Pygall SR. 2012. A formulation case study comparing the dynamic gastric model with conventional dissolution methods. *Dissolution Technologies.* 19 (4): 14–9.
- Marciani L, Young P, Wright J, Moore R, Coleman N, Gowland PA, Spiller RC. 2001. Antral motility measurements by magnetic resonance imaging. *Neurogastroenterol Motil.* 13 (5): 511-518.
- Markopoulos C, Andreas C, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. 2015. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: choosing the appropriate test media. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93: 173–182.
- Mármol LÁ, Fischer PL, Wahl A, Schwöbel D, Lenz V, Sauer K, Koziol M. 2022. Application of tiny-TIM as a mechanistic tool to investigate the in vitro performance of different itraconazole formulations under physiologically relevant conditions. *Eur J Pharm Sci.* 173:106165.

- Martin LE, Bell JA, Carey PF, Dallas FAA, Dixon GT, Jenner WN. 1982. A review of pharmacokinetics and metabolism of ranitidine in animals and man. *Med Publ Found Symp Ser.* 5: 23–31.
- Martindale. 2020. In: Sweetman S, editor. *Martindale: The complete drug reference.* London UK: Pharmaceutical Press. Electronic version, Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado.
- Masaoka Y, Tanaka Y, Kataoka M, Sakuma S, Yamashita S. 2006. Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Eur J Pharm Sci.* 29 (3-4): 240-50.
- Mathias NR, Crison J. 2012. The use of modeling tools to drive efficient oral product design. *AAPS J.* 14 (3): 591-600.
- Matsumura N, Hayashi S, Akiyama Y, Ono A, Funaki S, Tamura N, Kimoto T, Jiko M, Haruna Y, Sarashina A, et al. 2020. Prediction characteristics of oral absorption simulation software evaluated using structurally diverse low-solubility drugs. *J. Pharm. Sci.* 109:1403–1416.
- McAllister M, Flanagan T, Boon K, Pepin X, Tistaert C, Jamei M, Abend A, Kotzagiorgis E, Mackie C. 2019. Developing Clinically Relevant Dissolution Specifications for Oral Drug Products-Industrial and Regulatory Perspectives. *Pharmaceutics.* 12 (1): 19.
- Mc Daid D, Deasy P. 1996. Formulation development of transdermal drug delivery system for amlodipine base. *Int. J. Pharm.* 133: 71-83.
- Mc Neil JJ, Mihaly GW, Anderson A, Marshall AW, Smallwood RA, Louis WJ. 1981. Pharmacokinetics of the H<sub>2</sub>-receptor antagonist ranitidine in man. *Br J Clin Pharmacol.* 12: 411–415.
- Mehvar R, Gross ME, Kreamer RN. 1990. Pharmacokinetics of atenolol enantiomers in humans and rats. *J Pharm Sci.* 79 (10): 881–885.
- Melander A, Stenberg P, Liedholm H, Scherstén B, Wöhlin-Boll E. 1979. Food induced reduction in bioavailability of atenolol. *Eur J Clin Pharmacol.* 16: 327-330.
- Mercuri A, Lo Curto A, Wickham MSJ, Craig DQM. 2008. Dynamic gastric model (DGM): a novel in vitro apparatus to assess the impact of gastric digestion on the droplet size of self-emulsifying drug-delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 60 (Suppl. 1): A-2.
- Meredith PA, Elliott HL. 1992. Clinical pharmacokinetics of amlodipine. *Clin Pharmacokinet.* 22: 22-31.
- Meriani F, Coceani N, Sirotti C, Voinovich D, Grassi M. 2004. In vitro nimesulide absorption from different formulations. *J Pharm Sci.* 93 (3): 540-52.
- Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER. 2003. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci.* 18 (2): 113-120.
- Mignon M, Chau NP, Nguyen-Phuoc BK, Sauvage M, Leguy F, Bonfils S. 1982. Ranitidine upon meal-induced gastric secretion: oral pharmacokinetics and plasma concentration effect relationships. *Br J Clin Pharmacol.* 14: 187–193.
- Miller NA, Reddy MB, Heikkinen AT, Lukacova V, Parrott N. 2019. Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling for First-In-Human Predictions: An Updated Model Building Strategy Illustrated with Challenging Industry Case Studies. *Clin Pharmacokinet.* 58: 727-746.
- Mitra A, Kesisoglou F. 2013. Impaired Drug Absorption Due to High Stomach pH: A Review of Strategies for Mitigation of Such Effect To Enable Pharmaceutical Product Development. *Molecular Pharmaceutics* 10 (11): 3970-3979.
- Mitra A, Suarez-Sharp S, Pepin XJH, Flanagan T, Zhao Y, Kotzagiorgis E, Parrott N, Sharan S, Tistaert C, Heimbach T, Zolnik B, Sjörgen E, Wu F, Anand O, Kakar S, Li M, Veerasinghan S, Kijima S, Santos SML, Ning B, Raines K, Rullo G, Mandula H, Delvadia P, Dressman J, Dickinson PA, Babiskin A. 2021. Applications of Physiologically Based Biopharmaceutics Modelling (PBBM) to Support Drug Product Quality: A Workshop Summary Report. *J Pharm Sci.* 110: 594-609.

- Mizoguchi M, Kataoka M, Yokoyama K, Aihara R, Wada K, Yamashita S. 2018. Application of an in vitro dissolution/permeation system to early screening of oral formulations of poorly soluble, weakly basic drugs containing an acidic pH-modifier. *J Pharm Sci.* 107 (9): 2404–10.
- Moneghini M, Carcano A, Zingone G, Perissutti B. 1998. Studies in dissolution enhancement of atenolol. Part I. *Int J Pharm.* 175: 177-183.
- Morris ME, Levy G. 1984. Renal clearance and serum protein binding acetaminophen and its major conjugates in humans (abstract). *J Pharm Sci.* 73: 1038-1041.
- Mudie DM, Shi Y, Ping H, Gao P, Amidon GL, Amidon GE. 2012. Mechanistic analysis of solute transport in an in vitro physiological two-phase dissolution apparatus. *Biopharm. Drug Dispos.* 33: 378–402.
- Nacionalni registar lekova. 2022. Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Beograd.
- Nagelschmitz J, Blunck M, Kraetzschmar J, Ludwig M, Wensing G, Hohlfeld T. 2014. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacol.* 6: 51-59.
- Najib NM, Idkaidek N, Adel A, Mohammed B, Al-Masri S, Admour I, Alam SM, Dham R. 2005. Comparative bioavailability of two brands of atenolol 100 mg tablets (Tensotin and Tenormin) in healthy human volunteers. *Biopharm Drug Dispos.* 26: 1-5.
- Nelson KG, Shah AC. 1987. Mass transport in dissolution kinetics I: convective diffusion to assess the role of fluid viscosity under forced flow conditions. *J. Pharm. Sci.* 76: 799–802
- Needs CJ, Brooks PM. 1985. Clinical pharmacokinetics of the salicylates. *Clin Pharmacokinet* 10 (2): 164–177.
- Neuhoff S, Yeo KR, Barter Z, Jamei M, Turner DB, Rostami-Hodjegan A. 2013. Application of permeability-limited physiologically-based pharmacokinetic models: Part II - prediction of P-glycoprotein mediated drug–drug interactions with digoxin. *J Pharm Sci.* 102: 3161–3173.
- Neuhofel AL, Wilton JH, Victory JM, Hejmanowsk LG, Amsden GW. 2002. Lack of bioequivalence of ciprofloxacin when administered with calcium-fortified orange juice: a new twist on an old interaction. *J Clin Pharmacol.* 42: 461-466.
- Noel M. 1979. Kinetic study of normal and sustained release dosage forms of metformin in normal subjects. *Res Clin Forums.* 1: 33-44.
- Obach RS. 1999. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsoms. *Drug Metab Dispos.* 27: 1350-1359.
- O'Driscoll CM, Griffin BT. 2008. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility—the potential impact of lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev.* 60 (6): 617-624.
- Oliary J, Tod M, Nicolas P, Petitjean O, Caillé G. 1992. Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers after single and repeated doses in man. *Biopharm Drug Disp.* 13: 337-44.
- Olivera ME, Manzo RH, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. 2011. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ciprofloxacin hydrochloride. *J Pharm Sci.* 100: 22–33.
- Ono A, Matsumura N, Kimoto T, Akiyama Y, Funaki S, Tamura N, Hayashi S, Kojima Y, Fushimi M, Sudaki H, et al. 2019. Harmonizing solubility measurement to lower inter-laboratory variance—progress of consortium of biopharmaceutical tools (CoBiTo) in Japan. *ADMET DMPK.* 7: 183–195.
- Paraiso RLM, Rose RH, Fotaki N, McAllister M, Dressman JB. 2020. The use of PBPK/PD to establish clinically relevant dissolution specifications for zolpidem immediate release tablets. *Eur J Pharm Sci.* 155: 105534.



- Pargal A, Kelkar MG, Nayak PJ. 1996. The effect of food on the bioavailability of ibuprofen and flurbiprofen from sustained release formulations. *Biopharm Drug Dispos.* 17 (6): 511-9.
- Paroĉić J, Vasiljević D, Ibrić S, Đurić Z. 2008. Tablet disintegration and drug dissolution in viscous media: Paracetamol IR tablets. *Int J Pharm.* 355: 93-99.
- Parr AF, Beihn RM, Franz RM, Szpunar GJ, Jay M. 1987. Correlation of ibuprofen bioavailability with gastrointestinal transit by scintigraphic monitoring of <sup>171</sup>Er-labeled sustained-release tablets. *Pharm Res.* 4: 486–489.
- Parrott N, Hainzl D, Scheubel E, Krimmer S, Boetsch C, Guerini E, Martin-Facklam M. 2014. Physiologically Based Absorption Modelling to Predict the Impact of Drug Properties on Pharmacokinetics of Bitopertin. *AAPS J.* 16 (5): 1077-1084.
- Parrott NJ, Yu LJ, Takano R, Nakamura M, Morcos PN. 2016. Physiologically Based Absorption Modeling to Explore the Impact of Food and Gastric pH Changes on the Pharmacokinetics of Alectinib. *AAPS J* 18:1464-1474.
- Patel HJ, Patel JS, Desai BG, Patel KD. 2010. Permeability studies of antihypertensive drug amlodipine besilate for transdermal delivery. *Asian J Pharm Clin Res.* 3: 31-34.
- Patel N, Turner DB, Polak S, Jamei M, Rostami-Hodjegan A. 2014. Conventional versus Physiologically-Based (PB)-IVIVK: Revisiting some successful and failed conventional IVIVK cases with PB-IVIVK. (Poster) 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology Lisbon, Portugal, March 31.
- Pavliv L, Rock A. 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled, single dose, crossover study of the pharmacokinetics, safety and tolerability of ibuprofen injection in healthy adult volunteers. 44<sup>th</sup> American Society of Health-System Pharmacists Midyear Meeting. Las Vegas. NV.
- Pentafragka C, Vertzoni M, Dressman J, Symillides M, Goumas K, Reppas C. 2020. Characteristics of contents in the upper gastrointestinal lumen after a standard high-calorie high-fat meal and implications for the in vitro drug product performance testing conditions. *Eur J Pharm Sci.* 155: 105535.
- Pentikäinen PJ, Neuvonen PJ, Penttilä A. 1979. Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. *Eur J Clin Pharmacol.* 16: 195-202.
- Pepin XJH, Flanagan TR, Holt DJ, Eidelman A, Treacy D, Rowlings CE. 2016. Justification of Drug Product Dissolution Rate and Drug Substance Particle Size Specifications Based on Absorption PBPK Modeling for Lesinurad Immediate Release Tablets. *Mol. Pharmaceutics.* 13 (9): 3256-3269.
- Pepin XJH, Huckle JE, Alluri RV, Basu S, Dodd S, Parrott N, Riedmaier AE. 2021. Understanding Mechanisms of Food Effect and Developing Reliable PBPK Models Using a Middle-out Approach. *The AAPS Journal.* 23 (1): 12.
- Perucca E, Richens A. 1979. Paracetamol disposition in normal subjects and in patients treated with antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol.* 7: 201–206.
- Peters SA, Dolgos H. 2019. Requirements to establishing confidence in physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models and overcoming some of the challenges to meeting them. *Clin. Pharmacokinet.* 58: 1355–1371.
- Pharmaceutical Profiles study number PPL-322. 1999. Pharmacoscintigraphic evaluation of the regional absorption of nimesulide delivered using InteliSite<sup>®</sup> capsule in healthy volunteers, Helsinn Healthcare, Nottingham, UK, data on file.
- Pithavala YK, Heizer WD, Parr AF, O'Connor Semmes RL, Brouwer KL. 1998. Use of the InteliSite capsule to study ranitidine absorption from various sites within the human intestinal tract. *Pharm Res.* 15: 1869–1875.
- Plaisance KI, Drusano GL, Forrest A, Bustamante CI, Standiford HC. 1987. Effect of dose size on bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 31: 956–958.

- Poelma FGJ, Breas R, Tukker JJ, Crommelin DJA. 1991. Intestinal absorption of drugs. The influence of mixed micelles on the disappearance kinetics of drugs from the small intestine of the rats. *J Pharm Pharmacol*. 43: 317–324.
- Polster CS, Atassi F, Wu SJ, Sperry DC. 2010. Use of artificial stomach-duodenum model for investigation of dosing fluid effect on clinical trial variability. *Mol Pharm*. 7 (5): 1533–8.
- Polster CS, Wu SJ, Gueorguieva I, Sperry DC. 2015. Mechanism for enhanced absorption of a solid dispersion formulation of LY2300559 using the artificial stomach duodenum model. *Mol Pharm*. 12 (4): 1131–40
- Portolés A, Puerro M, Terleira A, Rodriguez A, Caturla MC, Fernandez N, Vargas E. 2003. A new high-absorption rate paracetamol 500 mg formulation: A comparative bioavailability study in healthy volunteers. *Current therapeutic research*. 64 (7): 401-411.
- Potthast H, Dressman JB, Junginger HE, Midha KK, Oeser H, Shah VP, Vogelpoel H, Barends DM. 2005. Biowaiver monographs for immediate release solid dosage forms: Ibuprofen. *J Pharm Sci*. 94 (10): 2121-2131.
- Prescott LF. 1996. Paracetamol (acetaminophen). A critical bibliographic review (1<sup>st</sup> edition) London: Taylor and Francis.
- Proctor WR, Bourdet DL, Thakker DR. 2008. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug Metab Dispos*. 36: 1650-1658.
- Psachoulias D, Vertzoni M, Goumas K, Kalioras V, Beato S, Butler J, et al. 2011. Precipitation in and supersaturation of contents of the upper small intestine after administration of two weak bases to fasted adults. *Pharm Res*. 28 (12): 3145-58
- Pulkkinen V, Vuento M. 1991. Distribution of oral nimesulide in female genital tissues. *Biopharm Drug Disp*. 12: 113-7.
- Quareshi SA. 2006. Developing discriminatory drug dissolution tests and profiles: some thoughts for consideration on the concept and its interpretation. *Dissolut Technol*. 18-23.
- Rainsford KD. 2005. Nimesulide: actions and uses. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Rashid M, Sarfraz M, Arfat M, Hussain A, Abbas N, Hussain K, Bukhari NI. 2021. Prediction of pharmacokinetic parameters and dose of pregabalin gastroretentive formulation in healthy adults, healthy pediatrics and renal-impaired geriatrics. *J Drug Deliv Sci Technol*. 63: 102548.
- Rawlins MD, Collste P, Bertilsson L, Palmér L. 1975. Distribution and elimination kinetics of carbamazepine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 8 (2): 91-96.
- Reddy MB, Clewell III HJ, Lave T, Andersen EM. 2013. Physiologically based pharmacokinetic modeling: a tool for understanding ADMET properties and extrapolating to human. *New Insights into Toxic Drug Test*. p 197-217.
- Regazzi BM, Rondanelli R, Ciaroelli L, Bartoli AL, Rampini A. 1986. Evaluation of the absorption from three formulations. *Int Clin Pharm Res*. 6: 469-473.
- Reppas C, Friedel HD, Barker AR, et al. 2014. Biorelevant in vitro performance testing of orally administered dosage forms-workshop report. *Pharm Res*. 31 (7): 1867-1876.
- Rostami-Hodjegan A, Shiran MR, Ayesh R, Grattan TJ, Burnett I, Darby-Dowman A, Tucker GT. 2002. A new rapidly absorbed paracetamol tablet containing sodium bicarbonate. I. A four way crossover study to compare the concentration-time profile of paracetamol from the new paracetamol/sodium bicarbonate tablet and a conventional paracetamol tablet in fed and fasted volunteers. *Drug Dev Ind Pharm*. 28: 523–531.
- Rowland M, Riegelman S, Harris PA, Sholkoff SD. 1972. Absorption kinetics of aspirin in man following oral administration of an aqueous solution. *J Pharm Sci*. 61 (3): 379–385.
- Rumack BH. 2004. Acetaminophen misconceptions. *Hepatology*. 40: 10–15.

- Sadray S, Tajerzede H, Mohajer A, Mirfazaelian A, Rouini MR. 2003. Efficacy of urine samples in bioavailability study of ranitidine. DARU volume 11, 2.
- Sagar KA, Smyth MR. 1999. A comparative bioavailability study of different aspirin formulations using on-line multidimensional chromatography. J Pharm Biomed Anal. 21: 383-392.
- Sakamoto A, Izutsu K, Yoshida H, Abe Y, Inoue D, Sugano K. 2021. Simple bicarbonate buffer system for dissolution testing: Floating lid method and its application to colonic drug delivery system. J Drug Del Sci Tech. 63: 102447.
- Sambol NC, Brookes LG, Chiang J, Goodman AM, Lin ET, Liu CY, Benet LZ. 1996. Food intake and dosage level, but not tablet vs solution dosage form, affect the absorption of metformin HCl in man. Br J Clin Pharmacol. 42: 510-512.
- Santos J, Lobato L, Vale N. 2021. Clinical pharmacokinetic study of latrepirdine via in silico sublingual administration. Silico Pharmacol. 9 (1): 29.
- Scheen AJ. 1996. Clinical pharmacokinetics of metformin. Clin Pharmacokinet. 30: 359-371.
- Scheubel E. 2010. Doktorska disertacija: Predictive *in vitro* dissolution tools: application during formulation development. Pharmacology. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I.
- Schilderink R, Protopappa M, Fleth-James J, Vertzoni M, Schaefer K, Havenaar R, Kulla I, Metzger M, Reppas C. 2020. On the usefulness of compendial setups and tiny-TIM system in evaluating the in vivo performance of oral drug products with various release profiles in the fasted state: Case example sodium salt of A6197. Eur J Pharm Biopharm. 149: 154-162.
- Segregur D, Flanagan T, Mann J, Moir A, Karlsson EM, Hoch M, Carlile D, Sayah-Jeanne S, Dressman J. 2019. Impact of Acid-Reducing Agents on Gastrointestinal Physiology and Design of Biorelevant Dissolution Tests to Reflect These Changes. J Pharm Sci. 108: 3461-3477.
- Selen A, Dickinson PA, Müllertz A, Crison JR, Mistry HB, Cruaños MT, Martinez MN, Lennernäs H, Wigal TL, Swinney DC, Polli JE, Serajuddin ATM, Cook JA, Dressman JB. 2014. The Biopharmaceutics Risk Assessment Roadmap for Optimizing Clinical Drug Product Performance. J Pharm Sci. 103: 3377-3397.
- Selen A, Müllertz A, Kesisoglou F, Ho RJY, Cook AU, Dickinson PA, Flanagan T. 2020. Integrated Multi-stakeholder Systems Thinking Strategy: Decision-making with Biopharmaceutics Risk Assessment Roadmap (BioRAM) to Optimize Clinical Performance of Drug Products. AAPS J. 22: 97.
- Shah A, Lettieri J, Blum R, Millikin S, Sica D, Heller AH. 1996. Pharmacokinetics of intravenous ciprofloxacin in normal and renally impaired subjects. J Antimicrob Chemother. 38: 103-116.
- Shah A, Liu M, Vaughan D, Heller AH. 1999. Oral bioequivalence of three ciprofloxacin formulations following single-dose administration: 500 mg tablet compared with 500 mg/10 ml or 500 mg/5 ml suspension and the effect of food on the absorption of ciprofloxacin oral suspension. J Antimicrob Chemother. 43: 49-54.
- Shebley M, Sandhu P, Emami Riedmaier A, Jamei M, Narayanan R, Patel A, Peters SA, Reddy VP, Zheng M, de Zwart L, Beneton M, Bouzom F, Chen J, Chen Y, Cleary Y, Collins C, Dickinson GL, Djebli N, Einolf HJ, Gardner I, Huth F, Kazmi F, Khalil F, Lin J, Odinecs A, Patel C, Rong H, Schuck E, Sharma P, Wu SP, Xu Y, Yamazaki S, Yoshida K, Rowland M. 2018. Physiologically Based Pharmacokinetic Model Qualification and Reporting Procedures for Regulatory Submissions: A Consortium Perspective. Clin. Pharmacol. Ther. 104: 88-110.
- Shep D, Shah S, Karwa M, Maroo S, Arora S, Patel K. 2012. Bioequivalence study of two tablet formulations of atenolol 100 mg after single oral administration in healthy subjects, J Pharm Res. 5 (3): 1445-1447.
- Shen J, Lee D, Mc Keag RG. 1995. Bioequivalence of two forms of ranitidine. New Zealand Pharmacy Oct.: 24-25.

- Sheng JJ, McNamara DP, Amidon GL. 2009. Toward an in vivo dissolution methodology: a comparison of phosphate and bicarbonate buffers. *Mol Pharm*. 6 (1): 29-39.
- Shohin IE, Ramenskaya GV, Vasilenko GF, Malashenko EA. 2010. In vitro Dissolution Kinetics of Amlodipine Tablets Marketed Under Biowaiver Conditions. *Dissolution Technol*. 17 (3): 20-22.
- Shrivas M, Khunt D, Shrivas M, Choudhari M, Rathod R, Misra M. 2019. Advances in In Vivo Predictive Dissolution Testing of Solid Oral Formulations: How Closer to In Vivo Performance? *J Pharm Innov*. 15: 296–317.
- Silva DA, Al-Gousous J, Davies NM, Nadia Bou Chacra, Webster GK, Lipka E, Amidon G, Löbenberg R. 2019. Simulated, biorelevant, clinically relevant or physiologically relevant dissolution media: The hidden role of bicarbonate buffer. *Eur J Pharm Biopharm*. 142: 8-19.
- Simcyp® Simulator, 2014. Available at: <http://www.simcyp.com/> (poslednji pristup, 7 September 2014).
- Singh S, Sharda N, Mahajan L. 1999. Spectrophotometric determination of pKa of nimesulide. *Int J Pharm*. 176: 261-4.
- Singh A, Singh P, Kapoor VK. 2001. Nimesulide. In: Britain HG, ed. *Analytical profile of drug substances and excipients (vol 28)*. New York (NY): Academic Press.
- Singla NK, Parulan C, Samson R, Hutchinson J, Bushnell R, Beja EG, Aug R, Royal MA. 2012. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetic parameters after single-dose administration of intravenous, oral, or rectal acetaminophen. *Int J Pharm*. 12 (7): 523-32.
- Sjögren E, Abrahamsson B, Augustijns P, Becker D, Bolger MB, Brewster M, Brouwers J, Flanagan T, Harwood M, Heinen C, Holm R, Juretschke HP, Kubbinga M, Lindahal A, Lukacova V, Münster U, Neuhoff S, Nguyen MA, van Perr A, Reppas C, Rostami-Hodjegan A, Tannergren C, Weitschies W, Wilson C, Zane P, Lennernäs H, Langguth P. 2014. In vivo methods for drug absorption—comparative physiologies, model selection, correlations with in vitro methods (IVIVK), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *Eur J Pharm Sci*. 57: 99–151.
- Sjögren E, Thörn H, Tannergren C. 2016. In silico modeling of gastrointestinal drug absorption: predictive performance of three physiologically based absorption models. *Mol Pharm*. 13: 1763-1778.
- Sjögren E, Thörn H, Tannergren C. 2017. Comment on “In Silico Modeling of Gastrointestinal Drug Absorption: Predictive Performance of Three Physiologically Based Absorption Models.” *Mol. Pharm*. 14: 340–343.
- Smith DE, Paliwal JK, Cox SR, Berardi RR, Dunn-Kucharski VA, Elta GH. 1994. The effect of competitive and non-linear plasma protein binding on the stereoselective disposition and metabolic inversion of ibuprofen in healthy subjects. *Biopharm Drug Disp*. 15: 545-561.
- Song NN, Li QS, Liu CX. 2006. Intestinal permeability of metformin using single-pass intestinal perfusion in rats. *World J Gastroenterol*. 12: 4064-4070.
- Souliman S, Blanquet S, Beyssac E, Cardot JM. 2006. A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: Applied to solid immediate release oral dosage form. *Eur J Pharm Sci*. 27: 72-79.
- Souliman S, Beyssac E, Cardot J-M, Denis S, Alric M. 2007. Investigation of the Biopharmaceutical Behavior of Theophylline Hydrophilic Matrix Tablets Using USP Methods and an Artificial Digestive System. *Drug Dev Ind Pharm*. 33: 475-483.
- Stewart BH, Chan OH, Lu RH, Reyner EL, Schmid HL, Hamilton HW, Steinbaugh BA, Taylor MD. 1995. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: Relationship to absorption in humans. *Pharm Res*. 12: 693–699.
- Stillhart C, Pepin X, Tistaert C, Good D, Van Den Bergh A, Parrott N, Kesisoglou F. 2019. PBPK absorption modeling: Establishing the in vitro–in vivo link-industry perspective. *AAPS J*. 21 (2): 1-13.

- Stillings M, Havlik I, Chetty M, Clinton C, Schall R, Moodley I, Muir N, Little S. 2000. Comparison of the pharmacokinetic profiles of soluble aspirin and solid paracetamol tablets in fed and fasted volunteers (abstract). *Curr Med Res Opin.* 16: 115–124.
- Stojković A. 2014. Biofarmaceutska karakterizacija interakcije ciprofloksacina i jona metala. Doktorska disertacija. Beograd.
- Sugano K. 2021. Lost in modelling and simulation? *ADMET & DMPK.* 9 (2): 75-109.
- Swarnakar NK, Venkatesan N, Betageri G. 2019. Critical In vitro Characterization Methods of Lipid Based Formulations for Oral Delivery: a Comprehensive Review. *AAPS PharmSciTech.* 20: 16.
- Takamatsu N, Kim ON, Welage LS, Idkaidek NM, Hayashi Y, Barnett J, Yamamoto R, Lipka E, Lennernas H, Hussain A, Lesko L, Amidon GL. 2001. Human jejunal permeability of two polar drugs: cimetidine and ranitidine. *Pharm Res.* 18: 742–744.
- Takeuchi S, Tsume Y, Amidon GE, Amidon GL. 2014. Evaluation of a three compartment in vitro gastrointestinal simulator dissolution apparatus to predict in vivo dissolution. *J Pharm Sci.* 103 (11): 3416–22.
- Tan SC, Patel BK, Jackson SH, Swift CG, Hutt AJ. 2002. Stereoselectivity of ibuprofen metabolism and pharmacokinetics following the administration of the racemate to healthy volunteers. *Xenobiotica.* 32: 683–697.
- Tannergren C, Bergendal A, Lennernas H, Abrahamsson B. 2009. Toward an increased understanding of the barriers to colonic drug absorption in humans: implications for early controlled release candidate assessment. *Mol Pharm.* 6: 60–73.
- Taylor EA, Turner P. 1981. The distribution of propranolol, pindolol and atenolol between human erythrocytes and plasma. *Br J Clin Pharmacol.* 12: 543-548.
- Torrado G, Carrascosa C, Torrado-Santiago S. 2001. Correlation of in vitro and in vivo acetaminophen availability from albumin microaggregates oral modified release formulations. *Int J Pharm* 217: 193–199.
- Tsume Y, Amidon GL, Takeuchi S. 2013. Dissolution effect of gastric and intestinal pH for a BCS class II drug, pioglitazone: new in vitro dissolution system to predict in vivo dissolution. *J Bioequivalence Bioavailability.* 5 (6): 224–7.
- Tsume Y, Mudie DM, Langguth P, Amidon GE, Amidon GL. 2014. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for *in vivo* predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVK, *Eur J Pharm Sci.* 57: 152-163.
- Tsume Y, Takeuchi S, Matsui K, Amidon GE, Amidon GL. 2015. In vitro dissolution methodology, mini-gastrointestinal simulator (mGIS), predicts better in vivo dissolution of a weak base drug, dasatinib. *Eur J Pharm Sci: Off J Eur Fed Pharm Sci.* 76: 203–12.
- Tucker GT, Casay C, Phillips PJ, Cannon H, Ward JD, Wood HF. 1981. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol.* 12: 235-246.
- United States Pharmacopeia and the National Formulary (USP 44 - NF39). 2021. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention.
- Van Den Abeele J, Brouwers J, Mattheus R, Tack J, Augustijns P. 2016. Gastrointestinal behavior of weakly acidic BCS class II drugs in man—case study of diclofenac potassium. *J Pharm Sci.* 105 (2): 687–96.
- Van Hecken AM, Tjandramaga TB, Mullie A, Verbesselt R, De Schepper PJ. 1982. Ranitidine: single dose pharmacokinetics and absolute bioavailability in man. *Br J Clin Pharmacol.* 14: 195– 200.
- Vardakou M, Mercuri A, Barker SA, Craig DQM, Faulks RM, Wickham MSJ. 2011. Achieving antral grinding forces in biorelevant in vitro models: comparing the USP dissolution apparatus II and the dynamic gastric model with human in vivo data. *AAPS PharmSciTech.* 12: 620–626.

- Varma MV, Steyn SJ, Allerton C, El-Kattan AF. 2015. Predicting clearance mechanism in drug discovery: extended clearance classification system (ECCS). *Pharm. Res.* 32: 3785-3802.
- Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. 2005. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the *in vivo* dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm.* 60: 413-417.
- Vertzoni M, Diakidou A, Chatziliadis M, Söderlind E, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. 2010. Biorelevant media to simulate fluids in the ascending colon of humans and their usefulness in predicting intracolonic drug solubility. *Pharm Res.* 27 (10): 187-96.
- Vidon N, Chaussade S, Noel M, Franchisseur C, Huchet B, Bernier JJ. 1988. Metformin in the digestive tract. *Diabetes Res and Clin Pr.* 4: 223-229.
- Voelker M, Hammer M. 2012. Dissolution and pharmacokinetics of a novel micronized aspirin formulation. *Inflammopharmacol.* 20: 225-231.
- Vogelpoel H, Welink J, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Moller H, Olling M, Shah VP, Barends DM. 2004. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *J Pharm Sci.* 93: 1945–1956.
- Volpe DA. 2004. Permeability classification of representative fluoroquinolones by a cell culture method. *AAPS PharmSci.* 6 (artical 13): 1-6.
- Vozech S, Schmidlin O, Taeschner W. 1988. Pharmacokinetic drug data. *Clin Pharmacokinet* 15: 254–282.
- Walker R and Whittlesea C. 2012. *Clinical Pharmacy and Therapeutics.* 5<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone.
- Wagner JG, Nelson E. 1963. Percent absorbed time plots derived from blood level and/or urinary excretion data. *J Pharm Sci.* 52: 610-611.
- Wan SH, Koda RT, Maronde RF. 1979. Pharmacokinetics, pharmacology of atenolol and effect of renal disease. *Br J Clin Pharmacol.* 7: 569-574.
- Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y. 2003. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 510-515.
- Wang Y. 2019. PBPK Current Status and Challenges: A Regulatory Perspective. Available from: <https://www.fda.gov/media/134099/download>.
- Wang K, Jiang K, Wei X, Li Y, Wang T, Song Y. 2021. Physiologically Based Pharmacokinetic Model are Effective Support for Pediatric Drug Development. *AAPS PharmSciTech.* 22 (6): 208.
- Wilding IR, Davis SS, Harly JG, Robertson CS, John VA, Powell ML, Leal M, Lloyd P, Walker SM. 1991. Relationship between systematic drug absorption and gastrointestinal transit after simultaneous oral administration of carbamazepine as a controlled-release system and as a suspension of <sup>15</sup>N-labelled drug to healthy volunteer. *Br J Clin Pharmacol.* 32 (5): 573-579.
- Willems M, Quartero AO, Numans ME. 2001. How useful is paracetamol absorption as a marker of gastric emptying? *Dig Dis Sci.* 46: 2256–2262.
- Williams MF, Dukes GE, Heizer W, Han Y-H, Hermann DJ, Lampkin T, Hak LJ. 1992. Influence of gastrointestinal site of drug delivery on the absorption characteristics of ranitidine. *Pharm Res.* 9: 1190–1194.
- Wilson CG, Washington N, Greaves JL, Kamali F, Rees JA, Sempik AK, Lampard JF. 1989. Bimodal release of ibuprofen in a sustained-release formulation: a scintigraphic and pharmacokinetic open study in healthy volunteers under different conditions of food intake. *Int J Pharm.* 50: 155-161.
- Woodings EP, Dixon GT, Harrison C, Carey P, Richards DA. 1980. Ranitidine—a new H<sub>2</sub>-receptor antagonist. *Gut* 21: 187–191.

- Wu CY, Benet LZ. 2005. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res.* 22(1): 11-23.
- Wu F, Cristofolletti R, Zhao L, Rostami-Hodjegan A. 2021. Scientific considerations to move towards biowaiver for biopharmaceutical classification system class III drugs: How modeling and simulation can help. *Biopharm Drug Dispos.* 42 (4): 118-127.
- Xia B, Yang Z, Zhou H, Lukacova V, Zhu W, Milewski M, Kesisoglou F. 2015. Development of a Novel Oral Cavity Compartmental Absorption and Transit Model for Sublingual Administration: Illustration with Zolpidem. *AAPS J.* 17 (3): 631-642.
- Xu H, Shi Y, Vela S, Marroum P, Gao P. 2018. Developing Quantitative In Vitro–In Vivo Correlation for Fenofibrate Immediate-Release Formulations With the Biphasic Dissolution-Partition Test Method. *J Pharm Sci.* 107 (1): 476-487.
- Yazdani M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A. 2004. The “high solubility” definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. *Pharm Res.* 21: 293–299.
- Yuvaneshwari K, Kollipara S, Ahmed T, Chachad S. 2022. Applications of PBPK/PBBM modeling in generic product development: An industry perspective. *J Drug Deliv Sci Technol.* 69: 103152.
- Zapater P, Lasso De La Vega MC, Horga JF, Such J, Frances R, Esteban A, Palazon JM, Carnicer F, Pascual S, Perez-Mateo M. 2004. Pharmacokinetic variations of acetaminophen according to liver dysfunction and portal hypertension status. *Aliment Pharmacol Ther.* 20: 29–36.
- Zhao GL, Wang HC. 1995. Drug release kinetics of ibuprofen coated granules and their *in vitro-in vivo* correlation. *Acta Pharm Sin.* 30: 291-297.
- Zhou M, Xia Li, Wang J. 2007. Metformin transport by newly cloned proton-stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine transporter) expressed in human intestine. *Drug Metab Dispos.* 35: 1956-1962.
- Žakelj S, Šturm K, Kristl A. 2006. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine *in vitro*. *Int J Pharm.* 313: 175-180.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Sofija Beloica (Stanković) je rođena 3. februara 1987. godine u Negotinu (Republika Severna Makedonija). Osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera završila je u Aleksincu sa odličnim uspehom, kao nocilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2005/2006. godine i diplomirala 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,00 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Od druge godine studija bila je stipendista Hemofarm fondacije a od treće godine studija stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka.

Od decembra 2011. godine do aprila 2018. godine bila je zaposlena na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju.

Od maja 2018. godine radi u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”. Do novembra 2019. godine bila je angažovana u Odseku za proizvodnju laktopreparata, a od decembra 2019. godine do danas kao Odgovorno lice za prijem, skladištenje, čuvanje i isporuku lekova i medicinskih sredstava. U martu 2019. godine stekla je zvanje istraživač-saradnik.

Sofija Beloica je autor 2 naučna rada objavljena u međunarodnim naučnim časopisima i autor/koautor 11 saopštenja prezentovanih na međunarodnim i domaćim skupovima.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Софија Белоица

Број индекса 07/11

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Механистичко моделовање и могућност предвиђања брзине растварања лековите супстанце из таблета *in vitro* и *in vivo*

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 14.07.2022. године

  
\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Софија Белоица

Број индекса 07/11

Студијски програм Фармацеутска технологија

Наслов рада Механистичко моделовање и могућност предвиђања брзине  
растварања лековите супстанце из таблета *in vitro* и *in vivo*

Ментор проф. др. Јелена Паројчић


Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 14.07.2022. године

  
\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић” да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Механистичко моделовање и могућност предвиђања брзине растварања лековите супстанце из таблета *in vitro* и *in vivo*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

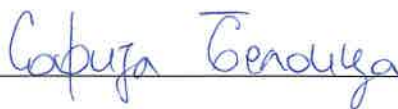
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 14.07.2022. године

  
\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.